

MESTRADO
MEDICINA LEGAL

Identificação de Potenciais Variações Genéticas no Sistema Endocanabinoide Associadas a Alterações no Bem-estar Geral e Afetividades de Uma População Univeristária

Andreia Sofia Rego Santos

M
2017



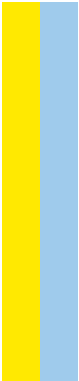
Andreia Santos. Identificação de Potenciais Variações Genéticas no Sistema Endocanabinoide Associadas a Alterações no Bem-estar Geral e Afetividade de Uma População Univeristária



M.ICBAS 2017

Identificação de Potenciais Variações Genéticas no Sistema Endocanabinoide Associadas a Alterações no Bem-estar Geral e Afetividades de Uma População Univeristária

Andreia Sofia Rego Santos



ANDREIA SOFIA REGO SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS VARIAÇÕES GENÉTICAS NO
SISTEMA ENDOCANABINOIDE ASSOCIADAS A ALTERAÇÕES
NO BEM-ESTAR GERAL E AFETIVIDADES DE UMA POPULAÇÃO
UNIVERSITÁRIA**

Dissertação de Candidatura ao Grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor Rui Medeiros.

Categoria – Professor associado.

Afiliação – à Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Coorientador – Professora Doutora Maria José
Pinto da Costa

Categoria – Professora associada

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar da Universidade do Porto.

INFORMAÇÃO TÉCNICA

TÍTULO:

Identificação de potenciais variações genéticas no sistema endocanabinóide associadas a alterações no bem-estar e afetividade de uma população universitária

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal, apresentada no Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar

AUTOR:

Andreia Sofia Rego Santos

DATA: Setembro de 2017

EDITOR: Andreia Sofia Rego Santos

MORADA: Rua da Villa Romana nº767

LOCALIDADE: Vila Cova, Barcelos

CÓDIGO POSTAL: 4750-791

CORREIO ELETRÓNICO: santos.avcb@gmail.com

1ª EDIÇÃO: Setembro 2017

“Queremos ter certezas e não dúvidas, resultados e não experiências, mas nem mesmo percebemos que as certezas só podem surgir através das dúvidas e os resultados somente através das experiências.”

Carl Jung

Agradecimentos

Gostaria, primeiramente, de agradecer à Prof.^a Doutora Maria José Pinto da Costa a oportunidade de frequentar este mestrado, que considero uma experiência enriquecedora não só na minha formação acadêmica como a nível pessoal e futuramente profissional.

Ao Prof. Doutor Rui Medeiros pela oportunidade de estagiar no grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, por me orientar ao longo deste percurso, por todos os conhecimentos transmitidos que, com certeza, colocarei em prática em todos os meus projetos futuros e, acima de tudo, por todo o apoio e confiança que depositou em mim, obrigada.

A todos os elementos do grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, muito obrigada por toda a simpatia, boa disposição e disponibilidade com que me acolheram neste período da minha formação.

Um especial agradecimento ao Mestre Augusto Nogueira, por toda a paciência, dedicação, disponibilidade e ajuda em todos os processos de elaboração desta dissertação e, acima de tudo, pela boa disposição constante e pelos momentos de descontração.

A todos participantes neste estudo, sem eles nada teria sido possível de concretizar.

A todos os meus colegas e amigos, em especial à Ana pela preocupação, apoio incondicional e energia transmitida, és a melhor. À minha Sheilinha, não tenho palavras para te agradecer tudo que fazes por mim. Às meninas da residência, em especial à Mariana por todas as loucuras e maluqueiras ao longo deste último ano, obrigada.

Ao Isac, um agradecimento especial pela paciência, transmissão de força e confiança, pelas palavras doces e carinhos diários.

Por fim, quero agradecer à minha família, em especial aos meus pais, que sempre se esforçaram para me conceder o melhor, quer a nível académico, quer a nível pessoal, obrigada por todo o carinho, compreensão, palavras de incentivo e acima de tudo pelo apoio incondicional. Não posso deixar de agradecer ao meu irmão que apesar das divergências merece todo o reconhecimento, obrigada.

Lista de siglas e abreviaturas

2-AG	2-araquidonoidglicerol
2-AGE	Éter de 2-araquidonildopamina
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BEP	Bem-estar psicológico
BES	Bem-estar subjetivo
C	Citosina
Ca ²⁺	Cálcio
CRH	Hormona estimuladora da corticotropina
°C	Graus Celsius
DAG	1,2-diacilglicerol
DAGL	Enzima diacilglicerol lípase
EMMBEP	Escala de Medida de Manifestação de Bem-Estar Psicológico
FAAH	Enzima hidrólase amida de ácidos gordos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
K ⁺	Potássio
MGL	Enzima lípase de monoacilglicerois
Na ⁺	Sódio
NADA	N-araquidonoildopamina
N-ArPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NAT	Enzima N-acetiltransferase
NMDA	N-metil-D-aspartato
p	Braço curto do cromossoma
<i>p</i>	Probabilidade
PANAS	<i>Positive and Negative Affect Schedule</i>
pb	Pares de bases
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol

PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA1	Ação da enzima fosfolipase A1
PLC	Enzima fosfolipase C
PLD	Enzima fosfolipase D
Pro	Prolina
q	Braço longo do cromossoma
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
T	Timina
THC	Δ^9 -tetra-hidrocanabinol
Thr	Treonina
UP	Universidade do Porto
μL	Microlitros
χ^2	Qui-Quadrado

Resumo

O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização, altamente complexo que está envolvido em inúmeras funções do nosso organismo. Tendo como principal propósito manter a homeostasia corporal. Alterações no correto funcionamento deste sistema podem levar a diferentes manifestações comportamentais entre os indivíduos. Entre estas variações de comportamento destacam-se os quadros de *stress* ou depressão, que parecem influenciar diretamente a expressão de afetos dos indivíduos, bem como o seu bem-estar geral. O sistema endocanabinóide torna-se, desta forma, uma mais-valia relativamente à compreensão do controlo emocional dos indivíduos. Sabe-se que, variações genéticas em genes associados a este sistema podem levar a alterações do seu funcionamento e, conseqüentemente, provocar desequilíbrios na homeostasia corporal e influenciar o estado geral de bem-estar de um indivíduo.

Assim, o principal objetivo deste estudo foi estabelecer uma possível associação entre polimorfismos em genes que codificam elementos chave do sistema endocanabinóide e o bem-estar e a afetividade dos indivíduos. A avaliação do bem-estar geral e da afetividade dos 164 participantes foi realizada através da aplicação de dois questionários específicos, tais como a Escala de Medida de Manifestação de Bem-Estar Psicológico (EMMBEP) e a escala *Positive and Negative Affect Schedule* (PANAS). O ADN genómico de cada indivíduo foi obtido através de uma amostra de saliva e o estudo dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 foi realizado pela metodologia de discriminação alélica através da técnica de PCR em Tempo Real.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram afirmar que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genotípicas e as diferentes categorias de ambos os questionários, para os dois polimorfismos estudados. Posteriormente, como base na divisão da população em quartis, foi possível constatar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a frequência dos genótipos e as diferentes categorias, à exceção da categoria dos afetos positivos no questionário PANAS para o polimorfismo *CNR1* rs1049353 ($p=0,023$). Além disso, os resultados apontam para a existência de uma possível associação entre os indivíduos com o genótipo CT do polimorfismo *CNR1* rs1049353 e os afetos positivos, mantendo população dividida em quartis ($p=0,031$). Adicionalmente, com a análise ajustada ao género,

constatou-se para os indivíduos heterozigóticos relativamente aos homozigóticos uma associação estatisticamente significativa entre os afetos positivos no questionário PANAS e o polimorfismo *CNR1* rs1049353 ($p=0,048$), assim como entre a categoria do controlo de si e dos acontecimentos no questionário EMMBEP e o polimorfismo *FAAH* rs324420 ($p=0,047$), apenas no género feminino. Por último, para o grupo de participantes com menor expressividade de afetos positivos, foi possível observar a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre os indivíduos pertencentes ao quartil 1 (Q1) relativamente aos do quartil 2 (Q2), quando comparados os indivíduos heterozigóticos com os portadores dos genótipos homozigóticos do polimorfismo *CNR1* rs1049353 ($p=0,008$). De modo a corroborar estes resultados, foi efetuada uma nova análise ajustada ao género e foi confirmada esta associação no grupo de indivíduos do sexo feminino com menor expressão de afetos positivos (Q1 vs. Q2, $p=0,020$).

Dado que este trabalho se focou no estudo de variantes genéticas em genes associados ao funcionamento do sistema endocanabinóide, os resultados obtidos poderão contribuir para uma melhor compreensão da complexidade do comportamento humano associado ao bem-estar e à afetividade.

Palavras-chave: Sistema endocanabinóide; gene *CNR1*; gene *FAAH*; polimorfismos genéticos; bem-estar; afetividade

Abstract

The endocannabinoid system is a sign system, highly complex which is related to several functions of our body, whose main purpose is to keep body homeostasis. Changes in the correct performance of this system may lead to different behaviors in human beings. Among these changes, the main ones are connected to stress or depression, which seem to affect the way human beings show their affection and their well-being. The endocannabinoid system, becomes, this way, a big asset to understand individual emotional control. One knows that genetic changes associated to this system, may lead to changes in its function, and cause unbalances in body homeostasis, and influence general well-being.

So, the main purpose of this study was to establish a possible relation between polymorphisms in genes that codify key elements from the endocannabinoid system and the well-being and affection of human beings. The assessment of the well-being and affection in 164 participants was made through two specific questionnaires, such as Psychological Well-being Manifestation Measure Scale (EMMBEP) and Positive and Negative Affect Schedule (PANAS). Genomics DNA was obtained from a saliva sample and the study of the *CNR1* rs1049353 and *FAAH* rs324420 polymorphisms was performed by allelic discrimination methodology through real time PCR technique.

The results from this work allow to say that they weren't found many differences between genotypic frequencies and the different questionnaires categories, for both studied polymorphisms. After that, based on population division in quartis, it was possible to note that there no significant differences between genotypic frequencies and the different questionnaires categories, exception made to positive affections in PANAS questionnaire for the *CNR1* rs1049353 polymorphism ($p=0,023$). Besides that, the results lead to the existence of a possible association between individuals with CT genotype of the *CNR1* rs1049353 polymorphism and positive affections, so population is divided in quartis ($p=0,031$). Moreover, with the analysis adjusted to gender, it was concluded that for heterozygous individuals, as opposed to homozygous individuals, a significant association between positive affections in PANAS questionnaire and *CNR1* rs1049353 polymorphism ($p=0,048$), as well as in self-control and events control, in EMMBEP questionnaire and *FAAH* rs324420 polymorphism ($p=0,047$), only in female gender. Finally, for the participants

group with less affection showing, it was possible to observe the existence of a significant relation between individuals belonging to quartile 1 (Q1), as opposed to quartile 2 (Q2), when compared the heterozygous individuals with homozygous genotypes of the *CNR1* rs1049353 polymorphism ($p=0,008$). To support these conclusions it was made a new observation adjusted to gender was motivated and it was confirmed this association in the participants group of the female gender with less positive affection (Q1 vs. Q2, $p=0.020$).

As this work was focused in genetic variants in genes related with endocannabinoid system, the conclusions obtained may contribute to a better understanding of the complexity of human behavior related to well-being and affection

Keywords: Endocannabinoid system; *CNR1* gene; *FAAH* gene; genetic polymorphisms; well-being; affection

Índice

Agradecimentos	I
Lista de siglas e abreviaturas	II
Resumo	IV
Abstract	VI
Índice	VIII
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XI
1. Introdução	1
1.1. Sistema Endocanabinóide	1
1.1.1. Recetores de canabinóides	1
1.1.2. Endocanabinóides	3
1.1.3. Vias de sinalização do sistema endocanabinóide	9
1.2. Endocanabinóides, bem-estar geral e afetividade.....	10
1.3. Variabilidade genética individual: polimorfismos genéticos	12
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Análise dos questionários	16
3.2. Procedimentos Laboratoriais	19
3.2.1. Extração de ADN.....	19
3.2.2. Genotipagem do polimorfismo rs1049353 no gene <i>CNR1</i> e do polimorfismo rs324420 no gene <i>FAAH</i>	19
3.3. Análise Estatística.....	20
4. Resultados	21
4.1. Avaliação do perfil de bem-estar geral e afetividade pela aplicação dos questionários EMMBEP e PANAS.....	21
4.2. Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420.....	22

4.3. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 de acordo com a média do índice correspondente às diferentes categorias dos questionários.....	23
5. Discussão	32
6. Conclusão	38
7. Referências bibliográficas	40

Índice de figuras

Figura 1 Localização do gene <i>CNR1</i> (Adaptado de (18)).	2
Figura 2 Representação esquemática da estimulação dos recetores de canabinóides e respetiva sinalização intracelular. (Adaptado de (2)).	2
Figura 3 Estrutura química dos ligandos endógenos dos recetores de canabinóides (Adaptado de (26)).	4
Figura 4 Mecanismo de síntese da Anandamida (AEA) (Adaptado de (26)).	5
Figura 5 Mecanismos de síntese do 2-arquidonoidglicerol (2-AG) (Adaptado de (26)).	6
Figura 6 Mecanismo de inativação dos endocanabinóides. Ambos os endocanabinóides são hidrolisados dentro das células pelas suas respetivas enzimas, a AEA pela FAAH e o 2-AG pela MGL (não representada na figura) (Adaptado de (26)).	8
Figura 7 Localização do gene <i>FAAH</i> (Adaptado de (48)).	8
Figura 8 Exemplos dos tipos de marcadores genéticos, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) e <i>Short Tandem Repeats</i> (STR) (Adaptado de (73)).	12
Figura 9 Representação esquemática das possíveis associações entre o polimorfismo <i>CNR1 rs1049353</i> e os afetos positivos tendo em conta a divisão por quartis (Q1 vs. Q2 e Q3 vs. Q4).	31
Figura 10 Modulação do sistema endocanabinóide quando existe um aumento do <i>stress</i> (Adaptado de (84)).	33

Índice de tabelas

Tabela 1 Efeitos biológicos no SNC e sistemas periféricos após a ativação dos recetores de canabinóides por parte dos seus agonistas endógenos (AEA e 2-AG) (Adaptado de (19)).	3
Tabela 2 Frequências alélicas do polimorfismo rs1049353 no gene <i>CNR1</i> e do polimorfismo rs324420 no gene <i>FAAH</i> a nível mundial e em diferentes continentes.	14
Tabela 3 Características da população em estudo.	16
Tabela 4 Escala <i>Positive and Negative Affect Schedule</i> (PANAS)	17
Tabela 5 Escala de Medida de Manifestação de Bem-Estar Psicológico (EMMBEP).	18
Tabela 6 Valores obtidos relativamente à média, mínimo e máximo para cada categoria dos questionários.	22
Tabela 7 Frequências genotípicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 na população em estudo.	23
Tabela 8 Frequências genotípicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 em função do género.	23
Tabela 9 Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>CNR1</i> rs1049353 na população em estudo de acordo com a média do índice correspondente às diferentes categorias dos questionários.	24
Tabela 10 Frequências dos genótipos do polimorfismo <i>FAAH</i> rs324420 na população em estudo de acordo com a média do índice correspondente às categorias dos questionários.	25
Tabela 11 Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 nas diferentes categorias dos questionários, de acordo com a divisão da população em quartis.	26
Tabela 12 Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 nas diferentes categorias dos questionários, de acordo com a divisão da população em quartis e ajustada ao género.	29
Tabela 13 Frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos <i>CNR1</i> rs1049353 e <i>FAAH</i> rs324420 na população portuguesa estudada e em outras populações continentais (Adaptado de (78, 81)).	36

1. Introdução

1.1. Sistema Endocanabinóide

O sistema endocanabinóide é um sistema de sinalização do nosso organismo, altamente complexo e que ainda não está totalmente compreendido pela comunidade científica. Sabe-se, porém, que é constituído por recetores de canabinóides, CB1 e CB2, e endocanabinóides, a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoidglicerol (2-AG) e por um mecanismo enzimático necessário à síntese e degradação destas moléculas (1, 2).

Sabe-se que o sistema endocanabinóide está envolvido em inúmeras funções do nosso organismo, tais como na modulação da resposta imune e inflamatória (3, 4) e na regulação da atividade motora (5). Além disso, pode influenciar a atividade do sistema cardiorrespiratório (6), o processo de memória (7) e do *stress* (8), entre outras funções (2). Contudo, o seu principal propósito é manter a homeostasia corporal, visto que este sistema tem ação direta no Sistema Nervoso Central (SNC) e indireta em todo o nosso organismo (9).

1.1.1. Recetores de canabinóides

Atualmente, encontram-se identificados pelo menos dois recetores de canabinóides, o recetor CB1 e o recetor CB2, ambos acoplados às proteínas G (10, 11). Contudo, pensa-se que haja um terceiro recetor, apesar de ainda não estar totalmente descrito (12).

O recetor CB1 é codificado pelo gene *CNR1*, o qual se encontra localizado no braço longo (q) do cromossoma 6 na posição 15 (figura 1) e foi descoberto inicialmente no cérebro, onde os seus níveis de expressão são mais altos (13). Este recetor é responsável pela maioria das respostas biológicas do nosso organismo, sendo considerado um recetor de domínio transmembranar que está presente, maioritariamente, nas membranas das células cerebrais, tais como neurónios e células da glia e também em outros órgãos periféricos (14, 15). Por sua vez, o recetor CB2, foi descoberto inicialmente nas células do sistema imunitário contudo, sabe-se que este também possui baixos níveis de expressão no cérebro (15, 16). Este recetor é o principal responsável pela resposta anti-

inflamatória e imunossupressão, uma vez que está presente nas membranas de células como linfócitos, macrófagos, monócitos, entre muitas outras (17).

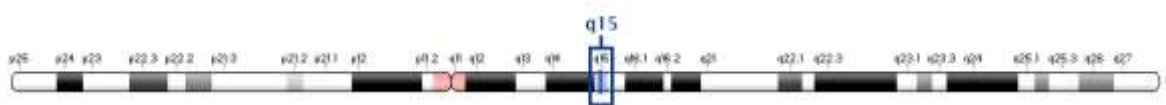


Figura 1 Localização do gene *CNR1* (Adaptado de (18)).

A estimulação de ambos os recetores conduz à ativação de inúmeras vias de transdução de sinal através das proteínas G, tal como descrito na figura 2. Porém este mecanismo é bastante complexo e ainda não está completamente elucidado (15).

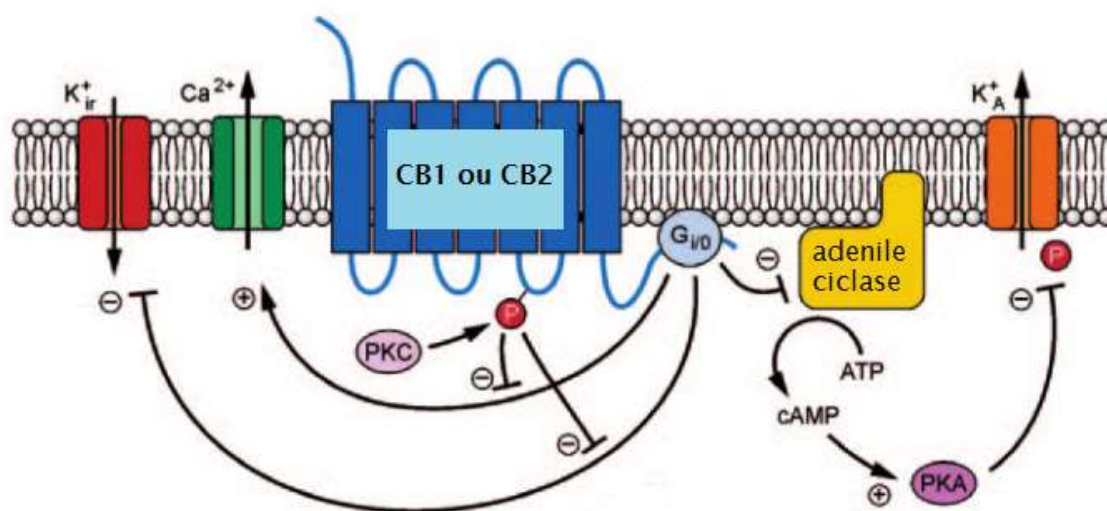


Figura 2 Representação esquemática da estimulação dos recetores de canabinóides e respetiva sinalização intracelular. (Adaptado de (2)).

Quando ocorre uma interação por parte dos endocanabinóides com os recetores CB1 e CB2, sucede-se a estimulação das proteínas G. Após a sua estimulação, estas proteínas inibem a atividade da adenil ciclase, levando à conversão de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc liga-se às subunidades reguladoras da proteína quinase A (PKA), fazendo com que esta liberte subunidades catalíticas. Estas subunidades fosforilizam os canais de potássio tipo-A (K_A^+), reduzindo assim o seu fluxo de iões (2, 15).

As proteínas G ativadas pelos recetores podem atuar de forma direta nos canais de cálcio (Ca^{2+}) e nos canais retificadores internos de potássio (K_{ir}^+). Isto

deve-se à ação da proteína quinase C (PKC), que após a sua ativação, fosforiliza o recetor, inibe os canais Ca^{2+} e ativa os canais K^{+}_{ir} (2, 15).

A ativação destas vias afeta todos os sistemas centrais e periféricos e conduz a várias atividades biológicas, algumas destas encontram-se descritas na tabela 1 (19).

Tabela 1 Efeitos biológicos no SNC e sistemas periféricos após a ativação dos recetores de canabinóides por parte dos seus agonistas endógenos (AEA e 2-AG) (Adaptado de (19)).

Sistema Nervoso Central	Sistemas Periféricos
Tálamo, hipotálamo e hipocampo Controlo da iniciação da dor Controlo dos ciclos de sono Controlo da termogénese Controlo da ingestão de alimentos Deterioração da memória de trabalho Inibição da transmissão glutamatérgica Gânglios basais e estriado Controlo de distúrbios psicomotores Interferência da transmissão dopaminérgica Inibição da transmissão do ácido gama-aminobutírico (GABA) Potencialização da catalepsia mediada por GABA Cortex, cerebelo e medula espinal Bloqueio de recetores de N-metil-D-aspartato (NMDA) Controlo de tremor e espasticidade Retina Controlo da visão escotópica	Sistema Cardiovascular Diminuição profunda da pressão arterial (hipotensão) e frequência cardíaca (bradicardia) Indução de hipotensão durante choque hemorrágico Vasodilatação Agregação de plaquetas Sistema Imunitário Estimulação do crescimento de células hematopoiéticas Inibição da libertação do fator inibidor da leucemia Inibição do recrutamento neutrófilos Trato digestivo Inibição dos movimentos peristálticos Inibição da motilidade intestinal Fígado Controlo da lipogénese e equilíbrio da energia periférica

1.1.2. Endocanabinóides

Os endocanabinóides são neurotransmissores, derivados do ácido araquidónico, que modulam o impulso nervoso. Devido à sua estrutura química são muito lipofílicos, não necessitando assim, de vesículas transportadoras como os normais neurotransmissores (1).

Atualmente encontram-se descritos dois principais canabinóides endógenos, a AEA, descoberta em 1992 (20) e o 2-AG, descoberto mais tarde, em 1995 (21). Ambos são agonistas endógenos dos recetores de canabinóides, CB1 e CB2, embora com diferentes funções no organismo, bem como diferentes

afinidades para estes recetores (2). Outros ligandos endógenos têm sido descritos como capazes de interagir com os recetores CB1 e CB2, tais como o éter de 2-araquidonildopamina (noladina, 2-AGE) (22), o o-araquidonoiletanolamina (virodamina) (23) e o N-araquidonoildopamina (NADA) (24), no entanto os seus papéis ainda não estão totalmente definidos (25). A estrutura química destes endocanabinóides encontra-se representada na figura 3.

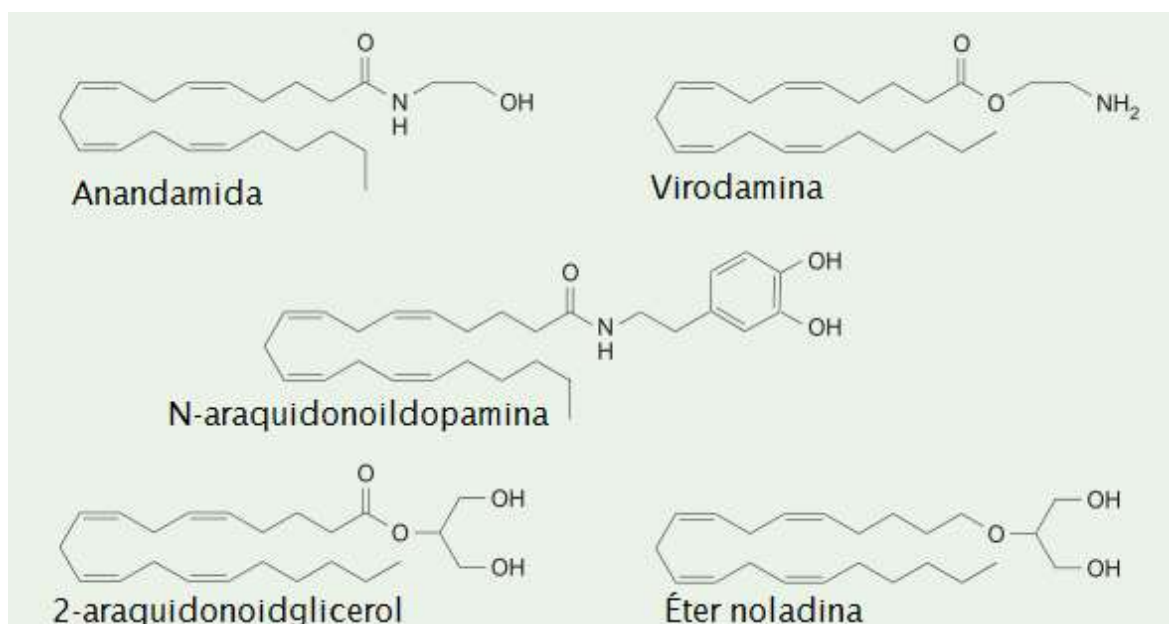


Figura 3 Estrutura química dos ligandos endógenos dos recetores de canabinóides (Adaptado de (26)).

O correto funcionamento de todo o sistema endocanabinóide depende da interação entre a síntese, a libertação e a inativação dos seus agonistas endógenos, os endocanabinóides (26).

1.1.2.1. *Síntese*

1.1.2.1.1. Anandamida

Os ácidos gordos de cadeia longa, ligados por uma ligação amida à fosfatidiletanolamina (PE), quando sofrem a ação da enzima fosfolipase D (PLD), dividem-se em ácidos gordos e etanolamidas. Estes últimos são moléculas sinalizadoras, como é o caso da AEA (26, 27).

O processo de síntese da AEA pode ser dividido em duas etapas distintas (figura 4). A primeira etapa consiste na catalisação da PE, através da ação da

enzima N-acetiltransferase (NAT), originando o composto N-araquidonilfosfatidiletanolamina (N-ArPE) (28, 29). A ativação da enzima NAT está dependente dos níveis de Ca^{2+} e de AMPc, uma vez que sem a presença de Ca^{2+} a enzima não efetua qualquer ação e a presença de AMPc faz com que esta aumente a sua atividade (30). Deste modo, toda a síntese da AEA está dependente dos níveis de Ca^{2+} , uma vez que a sua presença é essencial para a ativação da enzima NAT, um dos seus principais precursores (26).

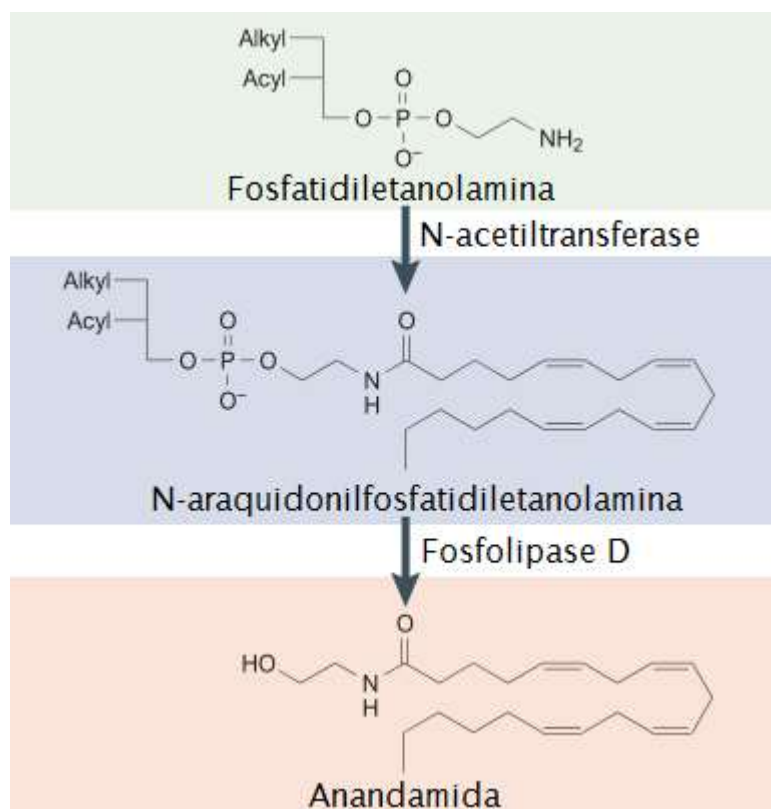


Figura 4 Mecanismo de síntese da Anandamida (AEA) (Adaptado de (26)).

A segunda etapa reside na ação da enzima PLD sobre o composto N-ArPE, formando a AEA e o ácido fosfatídico. Apesar da existência de N-ArPE no cérebro as suas reduzidas quantidades, são insuficientes para a formação da AEA, daí ser necessária a ação prévia da enzima NAT (28, 29).

Embora a formação da AEA esteja muito relacionada com as quantidades de Ca^{2+} , pensa-se que as proteínas G acopladas aos recetores também tenham um papel ativo neste processo (26). A ativação dos recetores de dopamina D_2 , pelos seus agonistas, demonstrou que ocorre um aumento até oito vezes mais de AEA libertada (31). Quando ocorre a ativação destes recetores existem duas teorias

possíveis. Uma teoria é que os recetores D_2 podem, de alguma forma, interagir com uma subunidade das proteínas G e levar a um estímulo da atividade da enzima PLD (32). A outra teoria baseia-se no facto de estes recetores serem capazes de interagir com uma outra subunidade das proteínas G e ativar a enzima fosfolipase C (PLC). Esta enzima, por sua vez, é responsável pela transformação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato em inositol-1,4,5-trifosfato, que pode ativar os mecanismos NAT/PLD, através do fluxo de Ca^{2+} (33).

1.1.2.1.2. 2-araquidonoidglicerol

A síntese de 2-AG parece ocorrer através de duas possíveis vias, o que pode justificar a existência de uma maior concentração de 2-AG no cérebro do que de AEA (cerca de 200 vezes mais) (figura 5). Esta diferença de concentração deve-se ao facto de o 2-AG não exercer apenas a função sinalizadora, mas também, a função de *housekeeping* (26, 34).

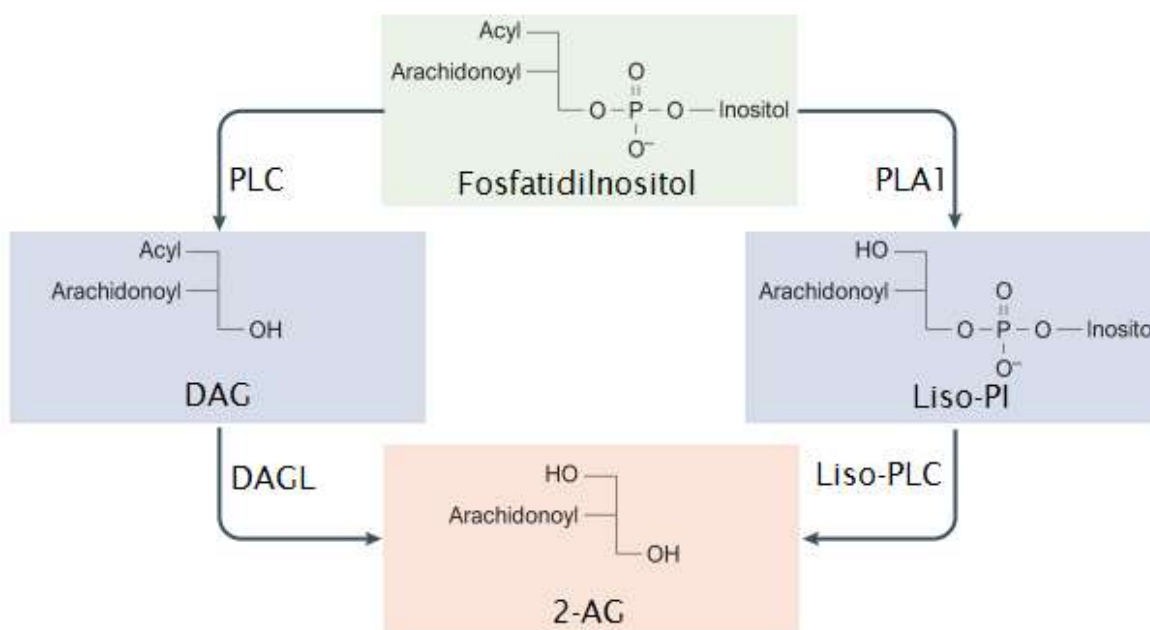


Figura 5 Mecanismos de síntese do 2-araquidonoidglicerol (2-AG) (Adaptado de (26)).

Ambas as possíveis vias de síntese do 2-AG iniciam-se com o composto fosfatidilinositol (PI). Numa das vias este é transformado em 1,2-diacilglicerol (DAG), através da ação da enzima PLC que posteriormente é convertido em 2-AG, pela ação da enzima diacilglicerol lípase (DAGL) (34). Outra via alternativa sugere que, o PI está sujeito à ação da enzima fosfolipase A1 (PLA1), dando origem ao

composto liso-fosfatidilinositol (liso-PI) que, por sua vez, pode ser hidrolisado pela ação da enzima liso-PLC originando o 2-AG (35).

1.1.2.2. *Libertação*

Ao contrário dos neurotransmissores que percorrem a fenda sináptica aquando da sua ação, os endocanabinóides tendem a permanecer na membrana fosfolipídica (26).

Existe a hipótese de que os endocanabinóides possam permanecer na célula onde foram sintetizados e interagirem com os seus recetores, movendo-se lateralmente na membrana até colidirem com estes (26).

Contudo, estudos já demonstraram a presença da AEA na fenda sináptica, o que conduz à hipótese de que os endocanabinóides são capazes de sair da célula onde foram sintetizados (36, 37). Wilson *et al.* comprovaram que os endocanabinóides são capazes de sair do neurónio pós-sináptico e atuar nos seus recetores, presentes na membrana do neurónio pré-sináptico adjacente (38-40).

Atualmente sabe-se que os endocanabinóides são capazes de atravessar a membrana fosfolipídica através de difusão facilitada. Para além disso, têm a capacidade de se ligarem a proteínas lipídicas extracelulares, como as lipocalinas, de forma a chegarem facilmente aos seus alvos (41). Esta característica está presente também na corrente sanguínea, uma vez que a AEA tem a capacidade de se ligar de forma irreversível à albumina sérica (42).

1.1.2.3. *Inativação*

A inativação dos endocanabinóides requer, uma primeira etapa, que consiste num transporte de volta à célula. Este transporte é realizado, ao contrário do normal transporte dos restantes neurotransmissores, sem que haja uma diferença de gradiente de sódio (Na^+). Pensa-se que possa ocorrer com recurso a proteínas transportadoras de lípidos, por mecanismos de difusão facilitada e a favor do gradiente de concentração, isto é, sem que seja necessário gasto de energia por parte da célula (43).

Uma vez dentro da célula, a AEA e o 2-AG são hidrolisados pelas enzimas hidrólase amida de ácidos gordos (FAAH) e lípase de monoacilgliceróis (MGL), respetivamente.

1.1.2.3.1. Enzima hidrólase amida de ácidos gordos (FAAH)

Foi descoberto em 1996, que a enzima FAAH era a principal responsável pela degradação da AEA, hidrolisando-a em ácido araquidónico e etanolamina (figura 6) (44). Pensa-se que esta enzima também contribui para a hidrólise do 2-AG, no entanto este facto ainda não foi totalmente comprovado (45).

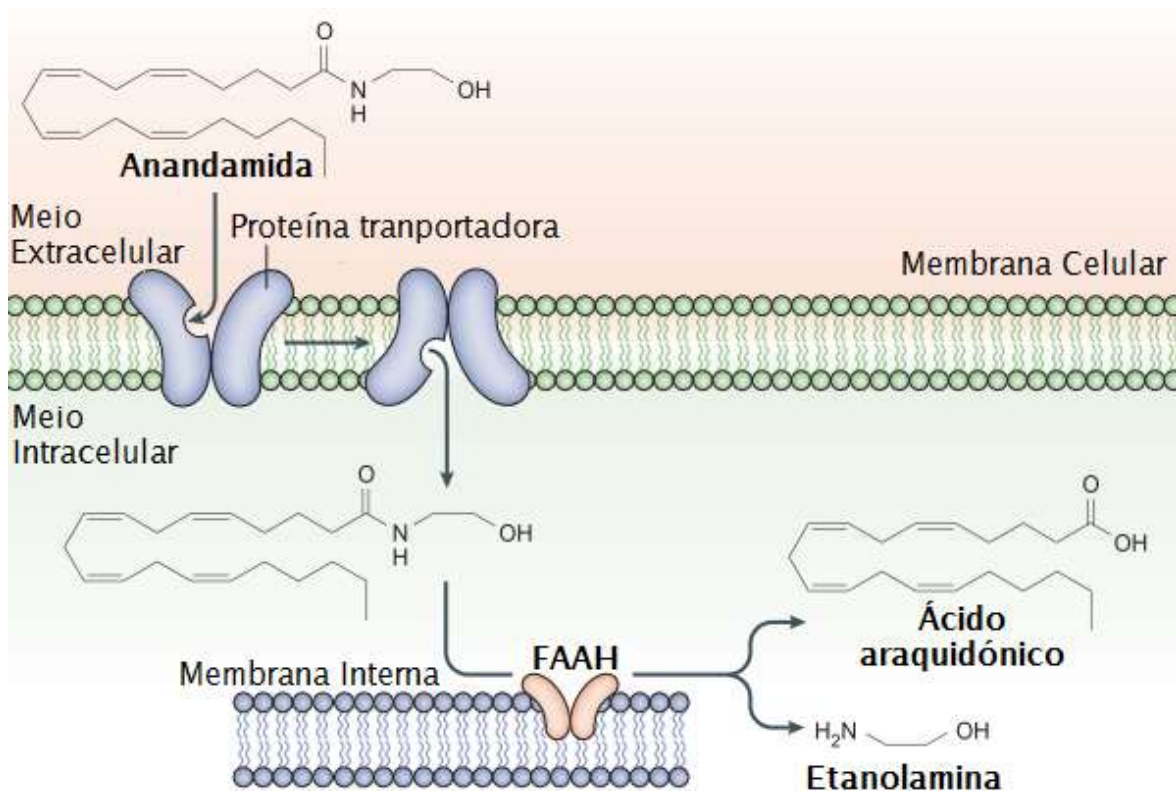


Figura 6 Mecanismo de inativação dos endocanabinóides. Ambos os endocanabinóides são hidrolisados dentro das células pelas suas respetivas enzimas, a AEA pela FAAH e o 2-AG pela MGL (não representada na figura) (Adaptado de (26)).

Esta enzima é codificada pelo gene *FAAH*, o qual está localizado no braço curto (p) do cromossoma 1 na posição 33 (figura 7) (46). É considerada uma enzima intracelular e tem a capacidade de hidrolisar, não só a AEA, mas também outras amidas bioativas (47). É ainda responsável por controlar as concentrações cerebrais destes compostos, tendo uma localização estratégica no cérebro (26).

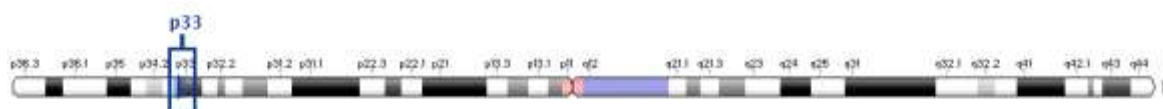


Figura 7 Localização do gene *FAAH* (Adaptado de (48)).

Esta enzima está presente em maior prevalência no cérebro e no fígado, apesar de se ter verificado a sua presença noutros tecidos, tais como, baço, pulmões, rins e testículos (44).

No cérebro, mais precisamente no hipocampo, no córtex e no cerebelo esta enzima localiza-se o mais perto possível das membranas dos terminais nervosos pós-sinápticos, onde estão presentes os recetores CB1. A sua localização indica que a FAAH tem uma participação ativa na inativação da AEA e que esta inativação ocorre nos neurónios pós-sinápticos (49).

1.1.2.3.2. Enzima lípase de monoacilglicerois (MGL)

À semelhança dos mecanismos de síntese, existe também mais do que um mecanismo de inativação do 2-AG, sendo o principal feito pela ação da enzima MGL (26). Em 1997, verificou-se que a MGL era a enzima responsável pela hidrólise de monoglicerídeos, como é o caso do 2-AG, transformando-os em glicerol e um ácido gordo (50).

Tal como acontece com a enzima FAAH, esta encontra-se distribuída essencialmente pelo SNC, no entanto não está localizada nos neurónios pós-sinápticos, mas sim nos terminais pré-sinápticos (26).

1.1.3. **Vias de sinalização do sistema endocanabinóide**

O sistema endocanabinóide parece ser responsável por vários mecanismos de sinalização celular, tais como:

- a. Atuar como modeladores da transmissão neuronal, operando no SNC como neurotransmissores em sentido retrógrado, reduzindo a libertação de neurotransmissores, como o glutamato e o GABA (51, 52);
- b. Autoinibir a atividade neuronal através da sinalização autócrina (53);
- c. Atuar de forma parácrina ou autócrina tanto em células neuronais, como em células da glia (54) e em células não neuronais, como é o caso dos adipócitos e hepatócitos (2);
- d. Interagir com sinalizadores intracelulares, uma vez que já foi verificado a existência de recetores de canabinóides no interior das células (2).

Deste modo, os endocanabinóides parecem atuar nas mais diversas formas de sinalização, o que torna o sistema endocanabinóide indispensável para o correto e normal funcionamento do nosso organismo.

1.2. Endocanabinóides, bem-estar geral e afetividade

Vários estudos têm vindo a demonstrar que alterações do funcionamento do sistema endocanabinóide podem levar a diferentes manifestações comportamentais entre os indivíduos. Entre estas variações de comportamento pode destacar-se os quadros de *stress* ou depressão, que parecem influenciar diretamente os afetos positivos e negativos dos indivíduos, bem como o seu bem-estar geral (8, 55, 56).

Somente, após a II Guerra Mundial a Psicologia começou a compreender o comportamento humano, baseando-se em conceitos como o otimismo, a felicidade e o bem-estar e não só baseado na Patologia (57). Apesar desta mudança de ideologia, continuou-se a defender que a ausência de doença por si só, não significava a presença de um estado de felicidade ou bem-estar (58).

De forma a reforçar esta ideia, muitos autores têm vindo a aprofundar a investigação neste sentido, de forma a alertar esta área do conhecimento para questões como as experiências positivas (emoções positivas, felicidade, bem-estar, esperança e alegria), as características positivas individuais (caracter, forças e virtudes) e as instituições positivas (organizações baseadas no sucesso e potencial humano) (59).

Tem vindo a ser reconhecido que a saúde mental não se trata apenas de reações negativas, como a depressão e ansiedade, mas também de um conjunto de afetos e de determinantes que fazem parte do nosso dia-a-dia e nos conduzem a um positivismo e, por conseguinte, a um bem-estar geral (60, 61).

Especificamente, a definição característica do afeto tem sofrido muitas alterações ao longo dos tempos, uma vez que é alvo de muita investigação e de uma diversidade de opiniões (61). Contudo, a sua definição exata pode basear-se em três domínios, tais como: o afeto estado, que corresponde ao bem-estar e às emoções positivas e negativas; o humor, ligado à ansiedade e à depressão e o afeto traço, diretamente relacionado com a personalidade (61).

O bem-estar é uma área muito abrangente, contudo e apesar das controvérsias acerca desta expressão fenotípica, existem duas principais correntes de pensamento, baseadas nas perspetivas hedónica e eudaimónica (62-64).

A perspetiva hedónica defende que o bem-estar consiste na avaliação subjetiva da felicidade e diz respeito às experiências de prazer e sofrimento. O bem-estar segundo esta perspetiva denomina-se de bem-estar subjetivo (BES) e

baseia-se no princípio da acumulação do prazer, evitando a dor (65). É também nesta perspetiva que se encaixa o afeto estado como componente emocional do bem-estar. Investigadores defendem que o afeto faz parte das medidas de bem-estar e que é considerado dimensão emocional deste, juntamente com a dimensão cognitiva e a satisfação com a vida (61, 65).

No seguimento da perspetiva anterior, a perspetiva eudaimónica caracteriza-se pelo seu foco no funcionamento psicológico positivo e na procura do desenvolvimento de valores como a autorrealização, o crescimento pessoal e a evolução humana (63). O bem-estar, segundo esta perspetiva, denomina-se de bem-estar psicológico (BEP) e consiste na análise dos nossos recursos psicológicos, tais como, processos cognitivos, afetivos e emocionais. Do seu agrupamento resultam seis dimensões principais: aceitação de si, relações positivas com os outros, domínio do meio, crescimento pessoal, objetivos de vida e autonomia, que são consideradas componentes do bem-estar e não um contributo para este (63, 66).

Assim, o BES identifica a satisfação e a felicidade da pessoa com base nas áreas da sua vida, ao passo que o BEP faz esta identificação com base nos seus recursos psicológicos, mencionados anteriormente (66).

O bem-estar é considerado uma característica emocional que pode ser facilmente influenciado tanto por fatores internos, como por fatores externos, tais como, o consumo de substâncias lícitas e ilícitas (67), baixa autoestima, insatisfação corporal (68), *stress* e problemas de ansiedade (69).

Deste modo, existe um instrumento de avaliação tanto para o BEP como para o afeto, de forma a avaliar, respetivamente, o bem-estar geral e o afeto positivo e negativo. Para medir o bem-estar é usual usar-se a Escala de Medida de Manifestação de Bem-Estar Psicológico (EMMBEP) (70). Por outro lado, para medir o afeto positivo e negativo é comum recorrer-se à escala *Positive and Negative Affect Schedule* (PANAS) (71).

Apesar da existência destes instrumentos de avaliação, por vezes, torna-se difícil prever o resultado exato de um determinado estudo sobre as características fenotípicas dos indivíduos. Esta variabilidade na expressão destas características poderá dever-se à combinação entre a componente genética e os fatores ambientais a que cada indivíduo se encontra sujeito. Especificamente, sabe-se que variações genéticas em genes associados ao sistema endocanabinóide, como nos genes *CNR1* e *FAAH*, podem levar a alterações na sua

expressão e, conseqüentemente, provocar um desequilíbrio deste sistema e influenciar o estado geral de bem-estar de um indivíduo (72).

1.3. Variabilidade genética individual: polimorfismos genéticos

A variabilidade genética individual ocorre devido a alterações ao nível da sequência do ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas alterações são identificadas e estudadas através de marcadores genéticos, mais conhecidas por polimorfismos de ADN. Os dois principais tipos de polimorfismos são denominados por *Short Tandem Repeats* (STR) ou polimorfismos de comprimento e *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) ou polimorfismos de posição (figura 8) (73).

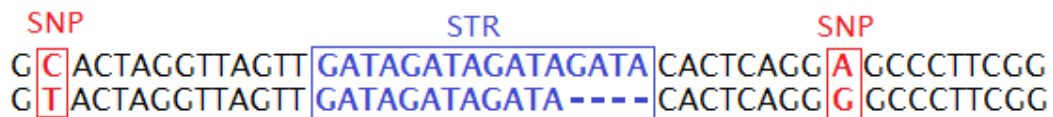


Figura 8 Exemplos dos tipos de marcadores genéticos, *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e *Short Tandem Repeats* (STR) (Adaptado de (73)).

Os STR são partes repetidas do nosso genoma (entre 2 a 6pb (pares de bases)), com elevada taxa de mutação e, portanto, ideais para estudos de grau de parentesco, migração e origem humana (74).

Os SNPs, tal como o próprio nome indica, são polimorfismos onde ocorre a troca de um único nucleótido em determinado local da cadeia de ADN e pensa-se que esta alteração ocorra uma vez a cada 100-300pb (73). Esta troca provoca uma alteração da sequência nucleotídica em indivíduos normais de uma população, onde o alelo de menor frequência está presente em pelo menos 1% dessa população (75). Estes têm um elevado interesse forense, pois por serem de reduzida dimensão, permitem a análise de amostras mais degradadas (73) e são também os polimorfismos mais comuns, representam cerca de 90% das variações genéticas conhecidas. De realçar que estas alterações podem ocorrer em qualquer parte do genoma, e por este motivo podem ou não afetar a proteína sintetizada, dependendo da sua localização (76).

Deste modo, se o SNP está localizado num exão, pode ocorrer uma mutação não silenciosa, o que conduz a uma mudança de aminoácido e conseqüentemente afeta a proteína resultante ou uma mutação silenciosa onde

não há alteração desta proteína. Por outro lado, se o SNP está localizado num intrão, pode estar em regiões codificantes de microARNs e afetar a expressão gênica, ou pode estar em zonas de *splicing* e alterar a sequência proteica e, ainda, pode estar na região promotora e provocar uma diminuição ou aumento da expressão de determinado gene (76).

Com os avanços na decodificação do genoma humano, tem sido cada vez mais possível a identificação de inúmeros polimorfismos genéticos e, conseqüentemente, a construção de perfis genéticos associados a diferentes características fenotípicas individuais.

Desta forma, o estudo de variações genéticas em genes envolvidos no sistema endocanabinóide, nomeadamente nos genes *CNR1* e *FAAH*, que estão frequentemente associados às alterações de afetos e bem-estar podem contribuir para uma possível caracterização destes traços de personalidade, com base na definição de perfis genéticos de suscetibilidade. Assim sendo, neste estudo tentou-se direcionar a pesquisa para a seleção de dois polimorfismos, o polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* e o polimorfismo rs324420 no gene *FAAH* que parecem influenciar a expressão destas características.

O polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* consiste na substituição do nucleótido Citosina (C) por uma Timina (T) na posição nucleotídica 1359, que resulta numa troca silenciosa no codão 453 (Treonina (Thr)), denominando-se por *CNR1 C1359T* (Thr453Thr; rs1049353) (77). Na população europeia, o alelo T apresenta uma percentagem de 26%, já na população africana, este mesmo alelo tem uma frequência de apenas 3% (78). Evidências apontam para que o alelo predominante deste polimorfismo esteja relacionado com a resistência ao tratamento antidepressivo e, conseqüentemente, a níveis de bem-estar mais baixos (79).

O polimorfismo rs324420 no gene *FAAH* consiste na substituição do nucleótido Citosina (C) por uma Adenina (A) na posição nucleotídica 385, traduzindo-se numa troca de aminoácidos de uma Prolina (Pro) por uma Thr no codão 129, denominando-se por *FAAH C385A* (Pro129Thr; rs324420) (80). Na população da península ibérica e africana, o alelo A apresenta uma percentagem de 16% e de 37%, respetivamente (81). Existe um estudo que demonstra que indivíduos portadores do alelo de baixa frequência apresentam uma baixa reatividade ao *stress* e habituem-se mais rapidamente a situações imprevisíveis, o que origina uma melhoria no bem-estar geral (72).

Tabela 2 Frequências alélicas do polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* e do polimorfismo rs324420 no gene *FAAH* a nível mundial e em diferentes continentes.

Distribuição geográfica	<i>CNR1</i> rs1049353		<i>FAAH</i> rs324420	
	C	T*	C	A*
Mundial	0.87	0.13	0.74	0.26
Africa	0.97	0.03	0.63	0.37
América	0.85	0.15	0.65	0.35
Este da Ásia	0.92	0.08	0.82	0.18
Sul da Ásia	0.83	0.17	0.80	0.20
Europa	0.74	0.26	0.79	0.21
• Península Ibérica	0.74	0.26	0.84	0.16

* Alelo de menor frequência.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o bem-estar geral e a afetividade numa população universitária, nomeadamente pelo efeito do património genético associado ao sistema endocanabinóide.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de bem-estar e afetividade dos participantes, com base nas respostas aos diferentes itens dos questionários EMMBEP e PANAS.
- Estudar os polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 a partir de amostras de saliva (zangafatoa bucal) dos indivíduos.
- Estabelecer uma possível associação entre o património genético e os resultados obtidos para o bem-estar geral e a afetividade.

3. Materiais e métodos

Para a realização deste trabalho experimental, foram recrutados ao acaso estudantes universitários da Universidade do Porto. Os indivíduos participantes neste estudo responderam a um inquérito anónimo, de modo a ser possível obter informação sobre o seu bem-estar geral e afetos, bem como algumas características sociodemográficas (sexo e idade). Além disso, cederam uma amostra biológica, através do método de zaragatoa bucal (saliva), após o seu conhecimento e consentimento prévios, que foi utilizada para a análise da sua caracterização genética relativamente às variações genéticas em estudo. Neste estudo, participaram cerca de cento e sessenta e quatro (164) indivíduos, dos quais cento e vinte e seis (126) são mulheres e trinta e oito (38) são homens, com uma idade média de 23,81 anos, desvio padrão de 5,084 e mediana de 22 anos. As características dos indivíduos incluídos neste estudo encontram-se apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 Características da população em estudo.

Características	Frequência	Percentagem (%)
Idade*		
Média \pm desvio padrão	23,81 \pm 5,084	
Mediana	22	
Sexo		
Feminino	126	76,8
Masculino	38	23,2
Total	164	100,0

*1 Indivíduo não colocou a idade no questionário, pelo que apenas se encontram representados 163 indivíduos.

3.1. Análise dos questionários

A cada participante foi atribuído dois questionários, com a finalidade de avaliar o seu bem-estar geral e a sua componente afetiva.

O questionário EMMBEP (Tabela 5) consiste num conjunto de itens para avaliar o bem-estar geral, no qual a escala de avaliação das respostas varia do 1 (Nunca) a 5 (Quase sempre). Este questionário pode ser dividido em seis categorias, felicidade (itens 5, 12, 20, 21, 22, 23, 24 e 25), autoestima (itens 1, 2, 3 e 4), equilíbrio (itens 6, 7 e 8), envolvimento social (itens 9, 10 e 11), sociabilidade (itens 13, 14, 15 e 16) e controlo de si e dos acontecimentos (itens 17, 18 e 19). Pode ser considerada ainda uma sétima categoria, o bem-estar geral, que consiste na soma das respostas de todos os itens. Por sua vez, o questionário PANAS (Tabela 4) é constituído por 20 itens que descrevem diferentes sentimentos/afetos e no qual a escala de avaliação das respostas pode variar de 1 (Nada ou muito ligeiramente) até ao 5 (Extremamente). Os itens deste questionário podem ser agrupados em duas categorias, tais como, os afetos positivos, que incluem 10 itens (interessado, excitado, agradavelmente surpreendido, caloroso, entusiasmado, orgulhoso, encantado, inspirado, determinado e ativo) e os afetos negativos, abrangendo os outros 10 itens (perturbado, atormentado, culpado, assustado, repulsa, irritado, remorsos, nervoso, trémulo e amedrontado).

Em ambos os questionários, as respostas aos diferentes itens de cada categoria são somadas, de forma a obter um valor mínimo e máximo para essa categoria. Desta forma, no questionário EMMBEP a felicidade pode obter no mínimo 8 e no máximo 40, a autoestima e a sociabilidade 4 e 20, o equilíbrio, o envolvimento social e o controlo de si e dos acontecimentos 3 e 15 e o bem-estar geral pode obter um valor mínimo de 25 e máximo de 125. No questionário PANAS, ambas as categorias, afetos positivos e afetos negativos, podem obter no mínimo 10 e no máximo 50.

Tabela 4 Escala *Positive and Negative Affect Schedule* (PANAS)

1 Nada ou muito ligeiramente	2 Um pouco	3 Moderadamente
4 Bastante		5 Extremamente
— Interessado	— Orgulhoso	
— Perturbado	— Irritado	
— Excitado	— Encantado	
— Atormentado	— Remorsos	
— Agradavelmente surpreendido	— Inspirado	
— Culpado	— Nervoso	
— Assustado	— Determinado	
— Caloroso	— Trémulo	
— Repulsa	— Ativo	
— Entusiasmo	— Amedrontado	

Tabela 5 Escala de Medida de Manifestação de Bem-Estar Psicológico (EMMBEP).

	Nunca	Rara mente	Algumas vezes	Frequente mente	Quase sempre
1 Senti-me confiante.	1	2	3	4	5
2 Senti que os outros gostavam de mim e me apreciavam.	1	2	3	4	5
3 Senti-me satisfeito com o que fui capaz de alcançar, senti-me orgulhoso de mim próprio.	1	2	3	4	5
4 Senti-me útil.	1	2	3	4	5
5 Senti-me emocionalmente equilibrado.	1	2	3	4	5
6 Fui igual a mim próprio, natural em todas as circunstâncias.	1	2	3	4	5
7 Vivi a um ritmo normal, não tendo cometido excessos.	1	2	3	4	5
8 A minha vida foi bem equilibrada entre as minhas atividades familiares, pessoais e académicas.	1	2	3	4	5
9 Tive objetivos e ambições.	1	2	3	4	5
10 Tive curiosidade e interesse em todo o tipo de coisas.	1	2	3	4	5
11 Envolvi-me em vários projetos.	1	2	3	4	5
12 Senti-me bem a divertir-me, a fazer desporto e a participar em todas as minhas atividades e passatempos preferidos.	1	2	3	4	5
13 Ri-me com facilidade.	1	2	3	4	5
14 Tive um grande sentido de humor, tendo feito os meus amigos rir facilmente.	1	2	3	4	5
15 Fui capaz de estar concentrado e ouvir os meus amigos.	1	2	3	4	5
16 Relacionei-me facilmente com as pessoas à minha volta.	1	2	3	4	5
17 Estive capaz de enfrentar situações difíceis de uma forma positiva.	1	2	3	4	5
18 Perante situações complexas, fui capaz de as resolver com clareza.	1	2	3	4	5
19 Fui capaz de encontrar resposta para os meus problemas sem preocupações.	1	2	3	4	5
20 Estive bastante calmo.	1	2	3	4	5
21 Tive a impressão de realmente gostar e viver a vida ao máximo.	1	2	3	4	5
22 Senti-me bem, em paz comigo próprio.	1	2	3	4	5
23 Achei a vida excitante e quis aproveitar cada momento dela.	1	2	3	4	5
24 A minha moral esteve boa.	1	2	3	4	5
25 Senti-me saudável e em boa forma.	1	2	3	4	5

3.2. Procedimentos Laboratoriais

3.2.1. Extração de ADN

A extração de ADN genómico da amostra de saliva foi feita com recurso ao Kit comercial da *Grisp Research Solutions*® (*GRS*® *Genomic DNA BroadRange*), de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente, colocou-se num *eppendorf* 500 µL de *Buffer* BR1, 20 µL de Proteinase K e a zaragatoa e incubou-se as amostras a 60°C durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à remoção da zaragatoa, adicionou-se 500 µL de *Buffer* BR2, vortexou-se e incubou-se as amostras novamente a 60°C durante 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de etanol a 100% e vortexou-se durante 10 segundos. De seguida, transferiu-se todo o conteúdo de cada amostra para uma coluna, centrifugou-se a 15000 g durante 1 minuto e trocou-se o reservatório. Seguidamente, adicionou-se 400 µL de *Wash Buffer* 1, centrifugou-se a 15000 g durante 1 minuto e trocou-se o reservatório. Adicionou-se 600 µL de *Wash Buffer* 2, centrifugou-se a 15000 g durante 4 minutos e trocou-se o reservatório. Transferiu-se a coluna para um *eppendorf* e adicionou-se 100 µL de *Elution Buffer*, previamente aquecido a 60°C, incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos e centrifugou-se durante 1 minuto. Por último, armazenou-se as amostras extraídas a -20°C.

3.2.2. Genotipagem do polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* e do polimorfismo rs324420 no gene *FAAH*

A caracterização dos polimorfismos na população estudada foi realizada por discriminação alélica, através da tecnologia TaqMan® (*Applied Biosystems*), utilizando a técnica de RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*). O *assay* utilizado para o polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* foi o C__1652590_10 em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC – alelo C, FAM – alelo T (ACATGGTTACCTTGGCAATCTTGAC[C/T]GTGCTCTTGATGCAGCTTTCTGCGG). Para o polimorfismo rs324420 no gene *FAAH* foi usado o *assay* C__1897306_10 em que as sondas marcadas com fluorocromos eram específicas para cada alelo: VIC – alelo A, FAM – alelo C (CTGTGAGACTCAGCTGTCTCAGGCC[A/C]CAAGGCAGGGCCTGCTCTATGGCGT).

A reação de amplificação, que perpez um volume de reação final de 6 µL/caso, continha 2,5 µL de 2x Taqman Universal Master Mix, 0,125 µL de 40x *Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Assay*, 2,375 µL de água dibestilada estéril (Braun®) e 1 µL de ADN (~20ng). As condições de amplificação basearam-se na ativação da Taq ADN Polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguindo-se 45 ciclos de 92°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C durante 1 minuto para emparelhamento dos primers e extensão. A amplificação foi destetada e analisada com recurso ao aparelho Real-Time 7300 ABI e através do *software 7300 System Sequence Detection* (versão 1.2.3. *Applied Biosystems*).

3.3. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa estatístico *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) (versão 24.0, SPSS Inc., 2015) e Epi Info (versão 7). O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi testado através da análise do teste Qui-Quadrado (χ^2) de forma a comparar as frequências genotípicas esperadas com as observadas. A análise pelo teste χ^2 foi também utilizada para comparação de diferentes variáveis contínuas. O teste *t-Student* foi aplicado para avaliar a existência de diferenças estatísticas entre os índices das diferentes categorias dos questionários e os genótipos dos polimorfismos estudados. O valor de *p* foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

4. Resultados

4.1. Avaliação do perfil de bem-estar geral e afetividade pela aplicação dos questionários EMMBEP e PANAS

Com base na análise das respostas obtidas nos questionários, é possível verificar que à exceção da categoria controlo de si e dos acontecimentos todas as restantes não contêm uma representação total da amostra. Esta perda de participantes deve-se ao facto de haver questionários com itens não respondidos ou respondidos de forma incorreta. A tabela 4 mostra as médias, os respetivos erros padrão bem como os mínimos e máximos das pontuações obtidas para cada categoria dos questionários.

No questionário EMMBEP, é possível observar que para a categoria felicidade apenas 154 indivíduos responderam corretamente a todos os itens, sendo que a pontuação mínima foi de 14, a máxima de 40 e a média dos questionários de 29,97. Relativamente à autoestima conta com 162 questionários válidos, tendo sido obtido um mínimo de 4, máximo 20 e uma média de 15,53. No que respeita a categoria do equilíbrio, 161 indivíduos responderam corretamente aos questionários, verificando-se um mínimo de 7, máximo 15 e uma média de 11,71. Em relação ao envolvimento social foram considerados 160 questionários, tendo sido observado um mínimo de 5, máximo de 15 e uma média da pontuação de 11,73. Na categoria sociabilidade foram incluídos 163 questionários, dos quais resultou um mínimo de 10, máximo de 20 e uma média de 16,45. A categoria do controlo de si e dos acontecimentos não obteve perda de questionários, tendo sido incluídos os 164 questionários respondidos pelos participantes e resultou num mínimo de 5, máximo de 15 e numa média da pontuação atribuída a cada item de 11,06. Por último, a categoria do bem-estar geral engloba um número menor de questionários incluídos, cerca de 146, do que as restantes categorias, dado que resulta da soma dos valores obtidos para todas as categorias analisadas. Deste modo, obteve-se uma pontuação mínima de 67, máxima de 121 e uma média da pontuação de 96,59.

No questionário PANAS, os afetos positivos contam com um total de 162 questionários, sendo que o mínimo obtido foi de 18, o máximo de 49 e a média 32,84. Relativamente aos afetos negativos, 163 indivíduos responderam

corretamente aos questionários, obtendo-se um mínimo de 10, máximo de 35 e uma média da pontuação de 17,87.

Tabela 6 Valores obtidos relativamente à média, mínimo e máximo para cada categoria dos questionários.

		Características			
		N	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Min	Max
EMMBEP	Felicidade	154	29,97 \pm 0,437	14	40
	Autoestima	162	15,53 \pm 0,186	4	20
	Equilíbrio	161	11,71 \pm 0,159	7	15
	Envolvimento social	160	11,73 \pm 0,143	5	15
	Sociabilidade	163	16,45 \pm 0,184	10	20
	Controlo de si e dos acontecimentos	164	11,06 \pm 0,154	5	15
	Bem-estar geral	146	96,59 \pm 0,995	67	121
PANAS	Afetos positivos	162	32,84 \pm 0,447	18	49
	Afetos negativos	163	17,87 \pm 0,463	10	35

N - tamanho da amostra; \bar{x} - média; SEM - *Standard Error of the Mean*; Min - mínimo; Max - máximo.

4.2. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420

A análise do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* na população em estudo, de acordo com os genótipos, permitiu observar que não existe diferenças entre as frequências genótípicas observadas e as esperadas para os polimorfismos *CNR1* rs1049353 ($p=0,851$) e *FAAH* rs324420 ($p=0,714$).

Quanto ao polimorfismo *CNR1* rs1049353 nos 164 indivíduos estudados, 59,7% são portadores do genótipo CC, 34,8% do genótipo CT e 5,5% do genótipo TT (tabela 5). Relativamente às frequências alélicas, para o alelo C foi de 77,1% e para o alelo T 22,9%. Em relação à distribuição dos genótipos do polimorfismo *FAAH* rs324420, dos 164 indivíduos incluídos no estudo, 67,7% apresentam o genótipo CC, 28,6% o genótipo CA e 3,7% o genótipo AA (tabela 7). Relativamente às frequências alélicas, para o alelo C obteve-se 82% e para o alelo A 18%.

Tabela 7 Frequências genotípicas dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 na população em estudo.

<i>CNR1</i> rs1049353			
Genótipo	CC	CT	TT
Frequência (%)	98 (59,7)	57 (34,8)	9 (5,5)
<i>FAAH</i> rs324420			
Genótipo	CC	CA	AA
Frequência (%)	111 (67,7)	47 (28,6)	6 (3,7)

Analisando os genótipos dos polimorfismos em função do gênero dos participantes, é possível concluir que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes genótipos dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 ($p=0,783$) e *FAAH* rs324420 ($p=0,375$) (tabela 6).

Tabela 8 Frequências genotípicas dos polimorfismos *CNR1*rs1049353 e *FAAH* rs324420 em função do gênero.

<i>CNR1</i> rs1049353				
Genótipo	CC	CT	TT	<i>p</i>
Feminino	77	42	7	0,783
Masculino	21	15	2	
<i>FAAH</i> rs324420				
Genótipo	CC	CA	AA	<i>p</i>
Feminino	85	35	6	0,375
Masculino	26	12	0	

p - valor de p obtido pelo teste de χ^2 .

4.3. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 de acordo com a média do índice correspondente às diferentes categorias dos questionários

A distribuição das frequências genotípicas para o polimorfismo *CNR1* rs1049353 em função das diferentes categorias dos questionários encontram-se apresentadas na tabela 9. Com base nos resultados obtidos é possível afirmar que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as

frequências dos genótipos da população em estudo e a média do índice das diferentes categorias de ambos os questionários, nomeadamente para a felicidade ($p=0,964$), a autoestima ($p=0,731$), o equilíbrio ($p=0,728$), o envolvimento social ($p=0,347$), a sociabilidade ($p=0,984$), o controlo de si e dos acontecimentos ($p=0,429$), o bem-estar geral ($p=0,651$), os afetos positivos ($p=0,223$) e os afetos negativos ($p=0,840$).

Tabela 9 Frequências dos genótipos do polimorfismo *CNR1* rs1049353 na população em estudo de acordo com a média do índice correspondente às diferentes categorias dos questionários.

		CNR1 rs1049353							
		CC		CT		TT		N	p
		N	\bar{x}	N	\bar{x}	N	\bar{x}		
EMMBEP	Felicidade	93	29,9	52	29,9	9	30,4	154	0,964
	Autoestima	97	15,4	56	15,7	9	15,3	162	0,731
	Equilíbrio	96	11,7	56	11,6	9	12,2	161	0,728
	Envolvimento social	97	11,7	54	11,8	9	10,9	160	0,347
	Sociabilidade	97	16,5	57	16,4	9	16,4	163	0,984
	Controlo de si e dos acontecimentos	98	11,0	57	11,1	9	11,9	164	0,429
	Bem-estar geral	90	95,9	47	97,9	9	97,2	146	0,651
PANAS	Afetos positivos	97	33,2	56	32,7	9	29,8	162	0,223
	Afetos negativos	97	18,1	57	17,6	9	17,1	163	0,840

\bar{x} – média; p – valor de p obtido pelo teste *t-Student*.

Em relação à distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo rs324420 no gene *FAAH* de acordo com as categorias dos questionários, é possível afirmar que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas designadamente para a felicidade ($p=0,183$), a autoestima ($p=0,731$), o equilíbrio ($p=0,122$), o envolvimento social ($p=0,424$), a sociabilidade ($p=0,972$), o controlo de si e dos acontecimentos ($p=0,750$), o bem-estar geral ($p=0,672$), os afetos positivos ($p=0,910$) e os afetos negativos ($p=0,602$) (tabela 10).

Tabela 10 Frequências dos genótipos do polimorfismo *FAAH* rs324420 na população em estudo de acordo com a média do índice correspondente às categorias dos questionários.

		FAAH rs324420							
		CC		CA		AA		N	p
		N	\bar{x}	N	\bar{x}	N	\bar{x}		
EMMBEP	Felicidade	104	29,6	46	31,1	4	27,3	154	0,183
	Autoestima	110	15,5	46	15,7	6	15,0	162	0,731
	Equilíbrio	109	11,7	46	12,0	6	10,2	161	0,122
	Envolvimento social	109	11,7	45	11,6	6	12,7	160	0,424
	Sociabilidade	111	16,4	46	16,5	6	16,7	163	0,972
	Controlo de si e dos acontecimentos	111	11,1	47	10,9	6	10,7	164	0,750
	Bem-estar geral	100	96,3	42	97,6	4	98,5	146	0,672
PANAS	Afetos positivos	109	32,8	47	32,8	6	37,8	162	0,910
	Afetos negativos	110	18,1	47	17,1	6	12,2	163	0,602

\bar{x} – média; *p* – valor de *p* obtido pelo teste t-Student.

De seguida, foi efetuada uma nova análise tendo em conta o género e a mediana das idades da população (indivíduos acima dos 22 anos de idade) e também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a distribuição dos genótipos para ambos os polimorfismos e a média do índice das diferentes características analisadas nos questionários.

Numa análise posterior, a análise da distribuição genotípica para os polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 foi realizada com base na divisão da população em quartis (Q1, Q2, Q3 e Q4), sendo que cada quartil corresponde a 25% da valoração de cada categoria dos questionários (tabela 11). Tendo em conta os resultados obtidos para ambos os polimorfismos foi possível constatar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a frequência dos genótipos e as diferentes categorias, à exceção da categoria dos afetos positivos no questionário PANAS para o polimorfismo *CNR1* rs1049353 (*p*=0,023).

Adicionalmente, tentou-se estabelecer uma associação entre os indivíduos heterozigóticos versus homozigóticos para ambos os polimorfismos e as diferentes categorias. Contudo apenas se observou que existe uma associação

estatisticamente significativa entre os portadores dos genótipos heterozigóticos do polimorfismo *CNR1* rs1049353 e os afetos positivos ($p=0,031$).

Tabela 11 Distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 nas diferentes categorias dos questionários, de acordo com a divisão da população em quartis.

		<i>CNR1</i> rs1049353				<i>p</i>
	Genótipo	Q1	Q2	Q3	Q4	
EMMBEP	Felicidade	CC	22	27	20	24
		CT	12	14	15	11
		TT	3	1	1	4
		CT vs. CC + TT	12	14	15	11
			25	28	21	28
	Autoestima	CC	29	20	22	26
		CT	12	10	15	19
		TT	2	3	3	1
		CT vs. CC + TT	12	10	15	19
			31	23	25	27
	Equilíbrio	CC	26	15	38	17
		CT	13	13	20	10
		TT	1	1	6	1
		CT vs. CC + TT	13	13	20	10
			27	16	44	18
	Envolvimento social	CC	24	16	37	20
		CT	14	7	23	10
		TT	3	4	1	1
		CT vs. CC + TT	14	7	23	10
			27	20	38	21
	Sociabilidade	CC	16	31	27	23
		CT	11	17	17	12
		TT	2	3	3	1
		CT vs. CC + TT	11	17	17	12
			18	34	30	24
	Controlo de si e dos acontecimentos	CC	23	33	22	20
		CT	17	14	8	18
		TT	1	2	4	2
		CT vs. CC + TT	17	14	8	18
			24	35	26	22
	Bem-estar geral	CC	22	20	28	20
		CT	9	14	11	13
		TT	2	4	1	2
		CT vs. CC + TT	9	14	11	13
			24	24	29	22

PANAS	Afetos positivos	CC	25	23	23	26	0,023
		CT	9	24	13	10	
		TT	5	0	3	1	
		CT vs. CC + TT	9	24	13	10	
	Afetos negativos	CC	27	21	22	27	0,804
		CT	14	17	13	13	
		TT	4	2	1	2	
		CT vs. CC + TT	14	17	13	13	
FAAH rs324420							
	Genótipo	Q1	Q2	Q3	Q4	p	
EMMBEP	Felicidade	CC	29	28	20	27	0,089
		CA	7	11	16	12	
		AA	1	3	0	0	
		CA vs. CC + AA	7	11	16	12	
	Autoestima	CC	30	20	27	33	0,761
		CA	10	12	12	12	
		AA	3	1	1	1	
		CA vs. CC + AA	10	12	12	12	
	Equilíbrio	CC	27	20	42	20	0,797
		CA	10	8	20	8	
		AA	3	1	2	0	
		CA vs. CC + AA	10	8	20	8	
	Envolvimento social	CC	27	21	40	21	0,579
		CA	14	5	17	9	
		AA	0	1	4	1	
		CA vs. CC + AA	14	5	17	9	
Sociabilidade	CC	18	38	32	23	0,897	
	CA	10	12	13	11		
	AA	1	1	2	2		
	CA vs. CC + AA	10	12	13	11		
Controlo de si e dos acontecimentos	CC	24	37	22	28	0,490	
	CA	15	10	12	10		
	AA	2	2	0	2		
	CA vs. CC + AA	15	10	12	10		

EMMBEP	Bem-estar geral	CC	24	26	25	25	0,701
		CA	8	10	15	9	
		AA	1	2	0	1	
		CA vs. CC + AA	8	10	15	9	0,554
			25	28	25	26	
PANAS	Afetos positivos	CC	29	29	22	29	0,180
		CA	10	15	14	8	
		AA	0	3	3	0	
		CA vs. CC + AA	10	15	14	8	0,515
			29	32	25	29	
	Afetos negativos	CC	28	28	22	32	0,696
		CA	16	10	12	9	
		AA	1	2	2	1	
		CA vs. CC + AA	16	10	12	9	0,431
			29	30	24	33	

Q1, Q2, Q3 e Q4 – quartis; p – valor de p obtido pelo teste de χ^2 .

Por último, mantendo a população agrupada por quartis, foi realizada uma nova análise ajustada ao género, de modo a verificar a existência de alguma associação entre os indivíduos heterozigóticos versus os portadores dos genótipos homozigóticos e as diferentes categorias avaliadas nos questionários, para ambos os polimorfismos (tabela 12). Os resultados obtidos demonstram que não foi possível constatar quaisquer correlações significativas na maioria das categorias dos questionários em ambos os géneros. Contudo pode-se observar uma associação estatisticamente significativa apenas nas mulheres, entre os afetos positivos no questionário PANAS e o polimorfismo *CNR1* rs1049353 ($p=0,048$), assim como entre a categoria do controlo de si e dos acontecimentos no questionário EMMBEP e o polimorfismo *FAAH* rs324420 ($p=0,047$).

Tabela 12 Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 nas diferentes categorias dos questionários, de acordo com a divisão da população em quartis e ajustada ao género.

<i>CNR1</i> rs1049353											
	Gen.	Homens				<i>p</i>	Mulheres				<i>p</i>
		Q 1	Q 2	Q 3	Q 4		Q 1	Q 2	Q 3	Q 4	
EMMBEP	Felicidade	CT vs. CC+TT	2 4	5 6	3 4	0,967	10 21	10 23	10 15	8 24	0,683
	Autoestima	CT vs. CC+TT	2 6	1 6	6 5	0,244	10 25	9 17	9 19	13 22	0,892
	Equilíbrio	CT vs. CC+TT	2 6	4 3	6 10	0,632	11 21	9 13	14 34	8 14	0,795
	Envolvimento social	CT vs. CC+TT	5 7	2 5	5 8	0,883	9 20	5 15	18 30	7 18	0,726
	Sociabilidade	CT vs. CC+TT	5 7	4 5	4 8	0,959	6 11	13 29	13 22	10 21	0,945
	Controlo de si e dos acontecimentos	CT vs. CC+TT	3 3	4 9	2 8	0,167	14 21	10 26	6 18	12 19	0,502
	Bem-estar geral	CT vs. CC+TT	3 5	3 4	4 8	0,780	6 19	11 20	7 21	10 20	0,713
	Afetos positivos	CT vs. CC+TT	2 7	6 6	4 4	0,567	7 23	18 17	9 22	7 22	0,048
	Afetos negativos	CT vs. CC+TT	3 8	5 4	5 5	0,488	11 23	12 19	8 18	11 24	0,907
<i>FAAH</i> rs324420											
	Gen.	Homens				<i>p</i>	Mulheres				<i>p</i>
		Q 1	Q 2	Q 3	Q 4		Q 1	Q 2	Q 3	Q 4	
EMMBEP	Felicidade	CA vs. CC+AA	2 4	2 7	4 7	0,842	5 26	9 24	12 13	9 23	0,074
	Autoestima	CA vs. CC+AA	3 5	1 6	4 8	0,745	7 28	11 15	8 20	8 27	0,236
	Equilíbrio	CA vs. CC+AA	1 7	2 5	8 8	0,218	9 23	6 16	12 36	7 15	0,948
	Envolvimento social	CA vs. CC+AA	5 7	2 5	3 10	0,792	9 20	3 17	14 34	7 18	0,609

EMMBEP	Sociabilidade	CA vs. CC+AA	5	3	1	3	0,142	5	9	12	8	0,644
			7	6	11	2		12	33	23	23	
	Controlo de si e dos acontecimentos	CA vs. CC+AA	3	4	1	4	0,285	12	6	11	6	0,047
			3	9	9	5		23	30	13	25	
	Bem-estar geral	CA vs. CC+AA	3	2	4	2	0,975	5	8	11	7	0,395
			5	5	8	3		20	23	17	23	
PANAS	Afetos positivos	CA vs. CC+AA	4	4	2	2	0,801	6	11	12	6	0,297
			5	8	6	6		24	24	19	23	
	Afetos negativos	CA vs. CC+AA	4	2	3	3	0,830	12	8	9	6	0,308
			7	7	7	4		22	23	17	29	

Gen. – genótipo; Q1, Q2, Q3 e Q4 – quartis; p – valor de p obtido pelo teste de χ^2

Numa análise posterior, para o polimorfismo *CNR1* rs1049353, foi realizada uma nova estratificação da população relativamente à característica dos afetos positivos, tendo sido consideradas duas categorias, nomeadamente indivíduos com menor expressão (Q1 vs. Q2) e maior expressão (Q3 vs. Q4) de afetos positivos (Figura 9). Com base nos resultados obtidos para o grupo de participantes com menor expressividade de afetos positivos, foi possível observar a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre os indivíduos pertencentes ao quartil 1 relativamente aos do quartil 2, quando comparados os indivíduos heterozigóticos e os portadores dos genótipos homozigóticos ($p=0,008$). Contudo, no grupo representativo dos indivíduos com maior expressão de afetos positivos, não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre os participantes do quartil 3 e 4, tendo em conta indivíduos heterozigóticos comparativamente aos homozigóticos ($p=0,550$). Adicionalmente, de modo a corroborar estes resultados, foi efetuada uma nova análise ajustada ao género. Os resultados demonstraram que no grupo de indivíduos com menor expressão de afetos positivos (Q1 vs. Q2), a associação estatisticamente significativa se mantinha nas mulheres heterozigóticas comparativamente com as portadoras dos genótipos homozigóticos ($p=0,020$). Contudo, nenhuma correlação positiva foi observada em relação aos homens ($p=0,195$). Relativamente ao grupo de participantes com maior expressividade de afetos positivos (Q3 vs. Q4), não foi verificada nenhuma associação significativa entre os homens heterozigóticos e os portadores dos genótipos homozigóticos ($p=0,614$), assim como entre as mulheres ($p=0,668$).

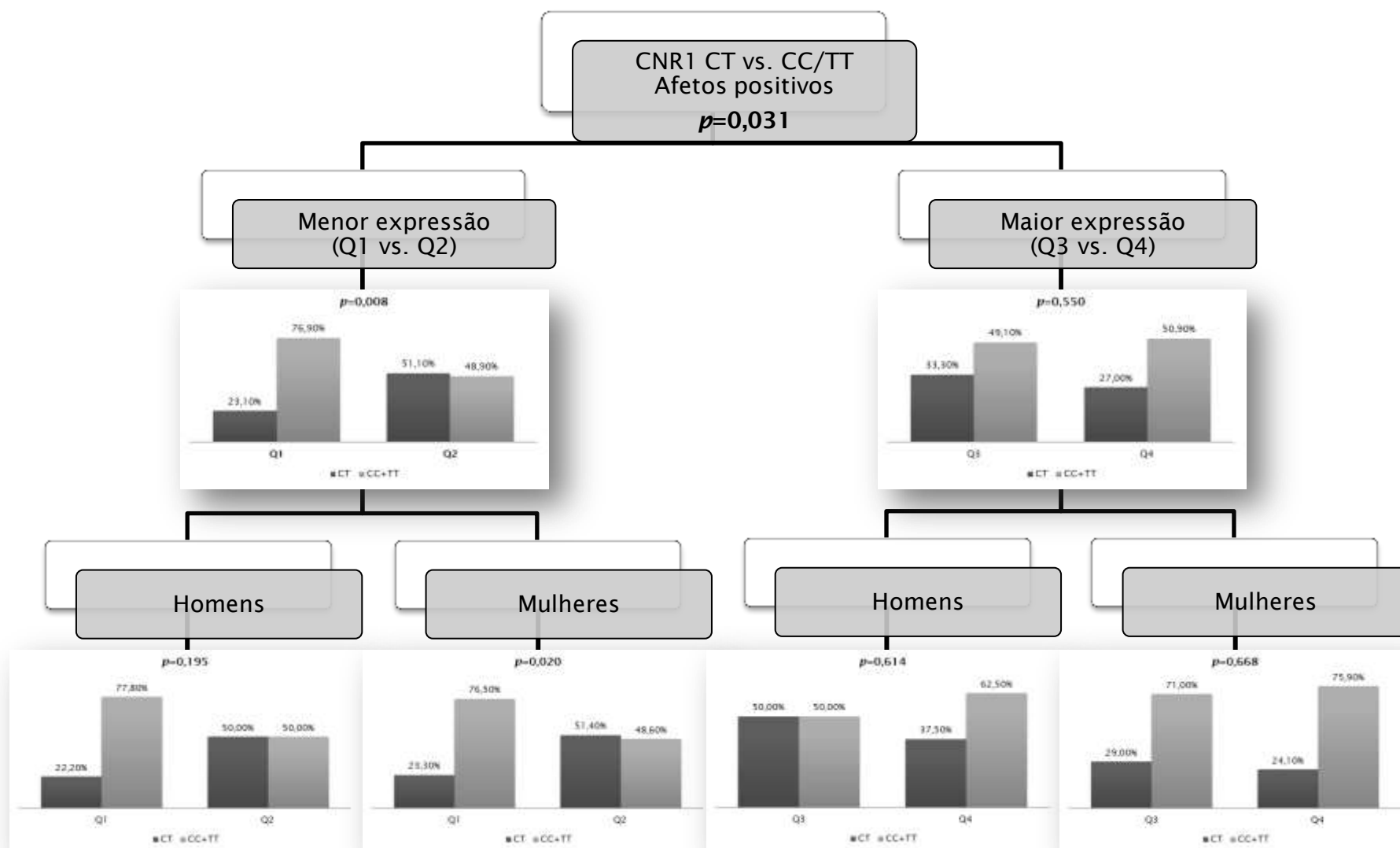


Figura 9 Representação esquemática das possíveis associações entre o polimorfismo *CNR1* rs1049353 e os afetos positivos tendo em conta a divisão por quartis (Q1 vs. Q2 e Q3 vs. Q4).

5. Discussão

O sistema endocanabinóide situa-se em diversas áreas do cérebro, tais como o hipocampo, a amígdala, o córtex pré-frontal, os núcleos da base, os núcleos *accumbens* e o sistema límbico que são responsáveis pelo controlo emocional, ansiedade, medo e *stress* (82-85).

O recetor CB1 assume uma elevada importância no sistema endocanabinóide, pois para além de ser o principal recetor, este também atua ao nível das transmissões nervosas provocando uma supressão da normal libertação dos neurotransmissores como o glutamato, o GABA e a dopamina (86, 87).

Quando ocorre um estímulo sucede-se a libertação de neurotransmissores e, conseqüentemente, uma ativação do terminal pós-sináptico. Esta ativação conduz a uma depolarização que leva à síntese de endocanabinóides, AEA e 2-AG. Estes, por sua vez, interagem com o recetor CB1, localizado no terminal pré-sináptico, de forma a suprimir a libertação de neurotransmissores (84). Pensa-se que esta supressão se deva à ação de gliotransmissores que são libertados pelos astrócitos após o influxo de Ca^{2+} (88, 89). Os gliotransmissores são moléculas sinalizadoras, que podem exercer as suas funções nos neurónios vizinhos, são capazes de modular a transmissão e a plasticidade sináptica e afetar o comportamento (89). Deste modo, o sistema endocanabinóide desempenha um papel importante no controlo emocional, envolvimento social e cognição. A ocorrência de um desequilíbrio interno ou externo neste sistema pode ter repercussões na vida social e na expressão afetiva dos seres humanos (90). Um exemplo de desequilíbrio externo encontra-se relacionado com um aumento de *stress* que pode ter como consequência direta o aumento da atividade da enzima FAAH na amígdala, devido à ação da hormona estimuladora da corticotropina (CRH) (91). Com a atividade da enzima aumentada ocorre uma diminuição da concentração de AEA, o que poderá levar à supressão do glutamato e, conseqüentemente, provocar um aumento de ansiedade (figura 10) (84).

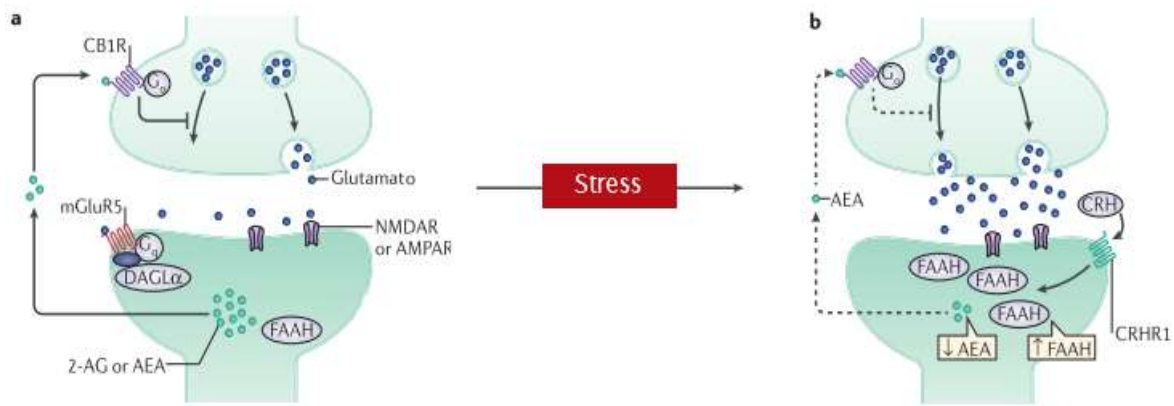


Figura 10 Modulação do sistema endocanabinóide quando existe um aumento do *stress* (Adaptado de (84)).

Contudo não são apenas os desequilíbrios externos que influenciam o funcionamento do sistema endocanabinóide, mas também os desequilíbrios internos como os polimorfismos que ocorrem nos genes que codificam os elementos deste sistema. Neste estudo foram analisados dois possíveis polimorfismos com potencial efeito no sistema endocanabinóide, nomeadamente associados aos recetores de canabinóides, *CNR1* rs1049353 e à enzima responsável pela degradação dos endocanabinóides, *FAAH* rs324420.

Relativamente ao polimorfismo *FAAH* rs324420, este parece ter um impacto na funcionalidade da enzima FAAH e, conseqüentemente, na sinalização do sistema endocanabinóide. Estudos em ratos demonstram que a inibição ou a interrupção da transcrição genética desta enzima causa um aumento dos níveis de endocanabinóides no cérebro, proporcionando um efeito ansiolítico e analgésico nesses animais (49, 92, 93). Este polimorfismo poderá levar à produção de uma enzima com atividade diminuída, conduzindo a um aumento da sinalização do sistema, uma vez que esta enzima tem um papel importante na degradação de endocanabinóides (94).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram uma associação estatisticamente significativa entre a categoria controlo de si e dos acontecimentos do questionário EMMBEP e os indivíduos portadores do genótipo CA para o polimorfismo *FAAH* rs324420, após a divisão da população em quartis, apenas no género feminino ($p=0,047$). Apesar de estudos anteriores têm vindo a demonstrar que indivíduos portadores do alelo A deste polimorfismo possuem reduzidos níveis de ansiedade (95, 96), não foi possível encontrar na literatura nenhuma justificação biológica para este resultado.

Quanto ao polimorfismo rs1049353 no gene *CNR1* apesar de este não causar mudanças na sequência de aminoácidos, pensa-se que possa alterar a função e expressão do recetor, pois ocorrem alterações ao nível da estabilidade e tradução ARNm mensageiro (97). Para além desta hipótese existe ainda a possibilidade deste polimorfismo poder estar em *linkage* com outros polimorfismos e, desta forma, potenciar alterações na atividade deste gene (79). Apesar do efeito funcional deste polimorfismo não estar totalmente esclarecido, sabe-se contudo que parece estar associado com alterações ao nível do funcionamento do sistema endocanabinoide.

Relativamente ao estudo deste polimorfismo, os resultados obtidos no nosso trabalho permitiram concluir que não foi possível estabelecer nenhuma associação estatisticamente significativa entre os diferentes genótipos e a média do índice das diferentes categorias de ambos os questionários. Contudo, após a divisão da população em quartis, verificou-se uma correlação positiva entre a distribuição dos genótipos e categoria dos afetos positivos no questionário PANAS ($p=0,023$). Estes resultados são concordantes com a literatura dado que várias evidências apontam para que indivíduos portadores do alelo T, para além de apresentarem uma maior atividade da amígdala, também têm uma maior reação às expressões faciais, sendo capazes de detetar mais rapidamente o medo ou tristeza em outros indivíduos (79, 98). Acredita-se que esta seja uma característica positiva pois indivíduos capazes de identificar o comportamento social negativo podem aumentar a responsabilidade positiva e, deste modo, controlar não só as suas emoções mas também as emoções dos que os rodeiam (98).

Adicionalmente, os resultados deste estudo revelaram uma associação estatisticamente significativa entre os afetos positivos e os indivíduos portadores do genótipo CT para o polimorfismo *CNR1* rs1049353 ($p=0,031$). Também foi possível observar a existência de uma correlação estatisticamente significativa entre os indivíduos pertencentes ao quartil 1 relativamente aos do quartil 2, quando comparados os indivíduos heterozigóticos e os portadores dos genótipos homozigóticos ($p=0,008$). Uma possível justificação para estes resultados centra-se no conceito *heterosis*, segundo o qual os indivíduos heterozigóticos podem apresentar uma expressão significativamente maior ou menor de determinada característica num marcador genético do que os indivíduos homozigóticos para qualquer alelo (99). Além disso, pensa-se que a estrutura funcional do recetor CB1 pode existir na forma de homodímero ou heterodímero (100). Assim, um

indivíduo heterozigótico pode apresentar recetores CB1 heterodímeros e, consequentemente originar um aumento ou diminuição da sua expressão o que resulta numa maior ou menor ativação do sistema endocanabinóide, respetivamente.

De forma a justificar os nossos resultados, pode-se colocar a hipótese de que os recetores heterodímeros estão associados a um aumento da expressão dos recetores CB1, provocando um aumento da sinalização do sistema endocanabinóide e, consequentemente uma diminuição da ansiedade contribuindo para uma maior expressão dos afetos positivos. Contudo, estudos adicionais serão necessários de modo a aprofundar os conhecimentos nesta área bem como confirmar os nossos resultados.

É ainda de realçar que, neste trabalho para o polimorfismo *CNR1* rs1049353, os resultados permitam verificar uma associação positiva entre as mulheres heterozigóticas relativamente às portadoras dos genótipos homozigóticas ($p=0,048$), particularmente no grupo de menor expressão de afetos positivos (Q1 vs. Q2) ($p=0,020$). Uma possível explicação para este resultado, poderá estar relacionada com o ambiente hormonal, uma vez que os estrogénios têm sido apontados como um possível fator influenciador do humor e das emoções (101). Sabe-se que, a diminuição dos níveis de estrogénios tem sido associada ao aumento de perturbações de humor, tais como ansiedade e depressão nas mulheres. Estudos realizados em animais (ratos fêmea) com ooforectomia, de forma a mimetizar os níveis de estrogénios na menopausa, mostraram um aumento de comportamentos ligados ao *stress*, ansiedade e depressão. No entanto, a reversão destes comportamentos era possível com a administração de estradiol (102-105). Neste contexto, tem sido demonstrado que os estrogénios modificam o comportamento emocional através da desregulação da expressão da enzima FAAH provocando assim um aumento da sinalização do sistema endocanabinóide e, consequentemente uma diminuição da ansiedade (106). Assim, dado que as mulheres apresentam níveis mais elevados de estrogénios que os homens, poderemos propor que a significância estatística observada nas mulheres está sob a influência desta hormona. Contudo mais estudos seriam necessários de forma a comprovar esta hipótese.

Para além dos desequilíbrios externos e internos que influenciam o correto funcionamento do sistema endocanabinóide, também as diferentes características culturais e ambientais, bem como o estilo de vida de cada região parecem ter um papel importante na variação das distribuições genóticas e alélicas entre

diferentes populações. É do conhecimento geral que a migração leva a que haja uma alteração das frequências alélicas, pois através da migração ocorre a introdução de alelos de uma população noutra causada pela reprodução destes indivíduos nessa mesma população. A tabela 12 ilustra o impacto que a migração poderá ter ao nível das diferentes frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos analisados neste estudo, nos diversos continentes. Desta forma, é possível verificar que à medida que a migração foi aumentando foram ocorrendo variações na distribuição dos genótipos, resultando na perda ou ganho de frequência de um determinado genótipo. Como exemplo, nas populações africanas (origem da migração) não existia registo da ocorrência do genótipo TT para o polimorfismo rs1049353 e é possível especular que à medida que a migração prosseguiu a frequência deste genótipo aumentou nos restantes continentes.

Tabela 13 Frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos *CNR1* rs1049353 e *FAAH* rs324420 na população portuguesa estudada e em outras populações continentais (Adaptado de (78, 81)).

População	<i>CNR1</i> rs1049353					<i>FAAH</i> rs324420				
	C%	T%	CC%	CT%	TT%	C%	A%	CC%	CA%	AA%
África	97,1	2,9	94,3	5,7	-	63,2	36,8	40,4	45,7	13,9
Este da Ásia	92,4	7,6	84,9	14,9	0,2	82,4	17,6	67,9	29,1	3
Sul da Ásia	82,5	17,5	68,9	27,2	3,9	80,5	19,5	65,4	30,1	4,5
América	85,3	14,7	73,5	23,6	2,9	64,8	35,2	42,6	44,4	13
Europa	74,2	25,8	55,5	37,4	7,1	78,9	21,1	62,2	33,4	4,4
Estudada	77,1	22,9	59,7	34,8	5,5	82	18	67,7	28,6	3,7

O presente estudo poderá ter interesse na área da medicina legal e ciências forenses, uma vez que, para além dos endocanabinóides, outras moléculas de origem natural são capazes de exercer funções no sistema endocanabinóide. Uma das moléculas mais estudadas é o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (THC), que, tal como a AEA possui uma alta afinidade para os recetores CB1 e influencia o normal funcionamento do sistema neurotransmissor (107-109). O THC (o principal princípio ativo da planta *Cannabis sativa*) é capaz de estimular a libertação de dopamina no córtex pré-frontal e nos núcleos *accumbens* (responsáveis pela sensação de prazer), produzindo assim um efeito estimulante e alucinogénio no SNC e, consequentemente, alterar o nosso controlo emocional.

Deste modo, o consumo desta droga de abuso parece estimular este sistema de uma forma semelhante aos nossos endocanabinóides. Assim, seria interessante perceber de que forma esta droga de abuso poderá influenciar as nossas emoções e se os polimorfismos estudados poderão ter um papel preponderante no mecanismo de ação desta molécula.

6. Conclusão

Desde que foi descoberto, o sistema endocanabinóide tem sido cada vez mais investigado e aprofundado pela comunidade científica, contudo ainda se desconhece todas as suas funcionalidades. Atualmente sabe-se que este sistema interfere com muitos dos nossos sistemas fisiológicos, principalmente com o SNC, tendo consequências diretas no comportamento humano, no bem-estar e na expressão dos afetos. Dado que o sistema endocanabinóide anda não está totalmente compreendido e uma vez que o comportamento humano é uma área bastante complexa, torna-se imprescindível uma investigação mais aprofundada, na tentativa de identificar variantes genéticas que possam alterar o normal funcionamento deste sistema e, assim, influenciar o bem-estar e os afetos.

Assim, os resultados deste estudo sugerem que as mulheres portadoras do genótipo CT para o polimorfismo *CNR1* rs1049353 possuem uma maior capacidade afetiva, principalmente no que respeita os afetos positivos, apesar desta característica ser mais visível em indivíduos com menor expressão de afetos positivos. Além disso, os resultados obtidos mostram ainda que o polimorfismo *FAAH* rs324420 parece não ter qualquer influência, quer no bem-estar, quer na expressão de afetos.

As principais limitações deste estudo encontram-se relacionadas com o número reduzido de participantes do género masculino, com a subjetividade nas respostas aos questionários usados para avaliar o bem-estar e a afetividade dos indivíduos e com a análise de apenas dois polimorfismos genéticos, uma vez que é sabido que existem inúmeras variantes genéticas que parecem influenciar o funcionamento do sistema endocanabinóide.

É de realçar que a importância médico-legal desta investigação poderá passar pela criação de perfis psicológicos e afetivos, de forma a complementar as áreas da psicologia e psiquiatria forense. Além disso, poderá ser útil para se tentar estabelecer uma associação entre o consumo de canábis e as alterações ao nível do SNC com repercussões ao nível emocional e comportamental do ser humano, que poderão ter uma aplicabilidade na área das Ciências Forenses.

Como perspetivas futuras, pretende-se aumentar o número de participantes no estudo, adicionalmente poderá ser aplicado um novo questionário mais direcionado para a afetividade, de forma a aprimorar o impacto e o efeito funcional que as variantes genéticas estudadas têm nos afetos

positivos. Além disso, poderá ser avaliada a importância de outros polimorfismos genéticos que estejam associados, quer ao sistema endocanabinóide, quer às variações de humor e afetividade.

7. Referências bibliográficas

1. Viveros MP, de Fonseca FR, Bermudez-Silva FJ, McPartland JM. Critical role of the endocannabinoid system in the regulation of food intake and energy metabolism, with phylogenetic, developmental, and pathophysiological implications. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2008;8(3):220-30.
2. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine reviews*. 2006;27(1):73-100.
3. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(4):486-96.
4. Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, et al. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1202-9.
5. van der Stelt M, Di Marzo V. The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *European journal of pharmacology*. 2003;480(1-3):133-50.
6. Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoid system as a potential target for drug development in the treatment of cardiovascular disease. *Current vascular pharmacology*. 2003;1(3):301-13.
7. Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 2002;418(6897):530-4.
8. Volkow ND, Hampson AJ, Baler RD. Don't Worry, Be Happy: Endocannabinoids and Cannabis at the Intersection of Stress and Reward. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2017;57:285-308.
9. Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*. 1998;21(12):521-8.
10. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-4.

11. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
12. Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, et al. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacology & therapeutics*. 2005;106(2):133-45.
13. Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, et al. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *The New biologist*. 1991;3(9):880-5.
14. Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, et al. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(5):1932-6.
15. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):161-202.
16. Cabral GA, Marciano-Cabral F. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *Journal of leukocyte biology*. 2005;78(6):1192-7.
17. Ashton JC, Smith PF. Cannabinoids and cardiovascular disease: the outlook for clinical treatments. *Current vascular pharmacology*. 2007;5(3):175-85.
18. National Center for Biotechnology Information. Chr6: 88.14M-88.17M - Genome Data Viewer [2017 Jun 08]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_000001405.36.
19. Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine reviews*. 2006;27(5):427-48.
20. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-9.
21. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*. 1995;50(1):83-90.
22. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(7):3662-5.

23. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;301(3):1020-4.
24. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8400-5.
25. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British journal of pharmacology*. 2004;141(5):765-74.
26. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(11):873-84.
27. Chapman KD. Emerging physiological roles for N-acylphosphatidylethanolamine metabolism in plants: signal transduction and membrane protection. *Chemistry and physics of lipids*. 2000;108(1-2):221-9.
28. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, et al. Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *European journal of biochemistry*. 1996;240(1):53-62.
29. Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(4):1226-42.
30. Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *The Journal of neuroscience*. 1996;16(12):3934-42.
31. Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature neuroscience*. 1999;2(4):358-63.
32. Senogles SE. The D2s dopamine receptor stimulates phospholipase D activity: a novel signaling pathway for dopamine. *Molecular pharmacology*. 2000;58(2):455-62.
33. Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, et al. D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type

- Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of neuroscience*. 2000;20(24):8987-95.
34. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997;388(6644):773-8.
 35. Pete MJ, Ross AH, Exton JH. Purification and properties of phospholipase A1 from bovine brain. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(30):19494-500.
 36. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-91.
 37. Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(21):12198-203.
 38. Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. 2001;410(6828):588-92.
 39. Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. 2001;29(3):729-38.
 40. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):8384-8.
 41. Beuckmann CT, Lazarus M, Gerashchenko D, Mizoguchi A, Nomura S, Mohri I, et al. Cellular localization of lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) in the central nervous system of the adult rat. *The Journal of comparative neurology*. 2000;428(1):62-78.
 42. Bojesen IN, Hansen HS. Binding of anandamide to bovine serum albumin. *Journal of lipid research*. 2003;44(9):1790-4.
 43. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. 1997;277(5329):1094-7.
 44. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604):83-7.

45. Ueda N, Puffenbarger RA, Yamamoto S, Deutsch DG. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Chemistry and physics of lipids*. 2000;108(1-2):107-21.
46. Wan M, Cravatt BF, Ring HZ, Zhang X, Francke U. Conserved chromosomal location and genomic structure of human and mouse fatty-acid amide hydrolase genes and evaluation of clasper as a candidate neurological mutation. *Genomics*. 1998;54(3):408-14.
47. Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 2005;48(8):1147-53.
48. National Center for Biotechnology Information. Chr1: 46.39M-46.42M - Genome Data Viewer [2017 Jun 08]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/browser/?context=genome&acc=GCF_000001405.36.
49. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(16):9371-6.
50. Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(43):27218-23.
51. Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological reviews*. 2003;83(3):1017-66.
52. Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Progress in neurobiology*. 2002;68(4):247-86.
53. Bacci A, Huguenard JR, Prince DA. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature*. 2004;431(7006):312-6.
54. Stella N. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*. 2004;48(4):267-77.
55. Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, et al. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiology of disease*. 2010;39(2):148-55.
56. Dirven BCJ, Homberg JR, Kozicz T, Henckens M. Epigenetic programming of the neuroendocrine stress response by adult life stress. *Journal of molecular endocrinology*. 2017;59(1):11-31.
57. Seligman ME, Csikszentmihalyi M. Positive psychology. An introduction. *The American psychologist*. 2000;55(1):5-14.

58. Diener E, Oishi S, Lucas RE. Personality, culture, and subjective well-being: emotional and cognitive evaluations of life. *Annual review of psychology*. 2003;54:403-25.
59. Seligman ME, Steen TA, Park N, Peterson C. Positive psychology progress: empirical validation of interventions. *The American psychologist*. 2005;60(5):410-21.
60. Diener E. Assessing Subjective Well-Being: Progress and Opportunities. *Social Indicators Research*. 1994;31(2):103-57.
61. Cohen S, Kessler RC, Gordon LU. *Measuring Stress: A Guide for Health and Social Scientists*: Oxford University Press; 1997.
62. Ryan RM, Deci EL. On happiness and human potentials: a review of research on hedonic and eudaimonic well-being. *Annual review of psychology*. 2001;52:141-66.
63. Ryff CD, Keyes CL. The structure of psychological well-being revisited. *Journal of personality and social psychology*. 1995;69(4):719-27.
64. Waterman AS. Two Conceptions of Happiness: Contracts of Personal Expressiveness (Eudaimonia) and Hedonic Enjoyment. *Journal of personality and social psychology*. 1993;64(4):678-91.
65. Diener E, Suh EM, Lucas RE, Smith HL. Subjective well-being: Three decades of progress. *Psychological Bulletin*. 1999;125(2):276-302.
66. Ryff CD. Happiness is everything, or is it? Explorations on the meaning of psychological well-being. *Journal of personality and social psychology*. 1989;57(6):1069-81.
67. Webb E, Ashton CH, Kelly P, Kamali F. Alcohol and drug use in UK university students. *Lancet*. 1996;348(9032):922-5.
68. Robins RW, Trzesniewski KH, Tracy JL, Gosling SD, Potter J. Global self-esteem across the life span. *Psychology and aging*. 2002;17(3):423-34.
69. Eisenberg D, Gollust SE, Golberstein E, Hefner JL. Prevalence and correlates of depression, anxiety, and suicidality among university students. *The American journal of orthopsychiatry*. 2007;77(4):534-42.
70. Monteiro S, Tavares J, Pereira A. Adaptação portuguesa da escala de medida de manifestação de bem-estar psicológico com estudantes universitários-EMMBEP. *Psicologia, Saúde & Doenças*. 2012;13(1):66.
71. Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *Journal of personality and social psychology*. 1988;54(6):1063-70.

72. Gunduz-Cinar O, MacPherson KP, Cinar R, Gamble-George J, Sugden K, Williams B, et al. Convergent translational evidence of a role for anandamide in amygdala-mediated fear extinction, threat processing and stress-reactivity. *Molecular psychiatry*. 2013;18(7):813-23.
73. Pereira V, Gusmão L. Types of Genomes, Sequences and Genetic Markers (Repeats, SNPs, Indel, Haplotypes). In: Amorim A, Budowle B, editors. *Handbook of forensic genetics : biodiversity and heredity in civil and criminal investigation*. New Jersey: World Scientific; 2017. p. 163-91.
74. Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *American journal of human genetics*. 1998;62(6):1408-15.
75. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86.
76. Monzó M, Navarro A, Ferrer G, Artells R. Pharmacogenomics: a tool for improving cancer chemotherapy. *Clinical & translational oncology*. 2008;10(10):628-37.
77. National Center for Biotechnology Information. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs1049353 [2017 Jan 25]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1049353.
78. Ensembl Home. rs1049353 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - Ensembl genome browser 89 [2017 Jun 22]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=6:88143416-88144416;v=rs1049353;vdb=variation;vf=761937.
79. Domschke K, Dannlowski U, Ohrmann P, Lawford B, Bauer J, Kugel H, et al. Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *European neuropsychopharmacology*. 2008;18(10):751-9.
80. National Center for Biotechnology Information. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs324420 [2017 Jan 25]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=324420.
81. Ensembl Home. rs324420 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - Ensembl genome browser 89 [2017 Jun 22]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:46404589-46405589;v=rs324420;vdb=variation;vf=200953.
82. Campolongo P, Trezza V. The endocannabinoid system: a key modulator of emotions and cognition. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2012;6(73):2.

83. Parsons LH, Hurd YL. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(10):579-94.
84. Lutz B, Marsicano G, Maldonado R, Hillard CJ. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(12):705-18.
85. Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 1997;77(2):299-318.
86. Castillo PE, Younts TJ, Chavez AE, Hashimotodani Y. Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 2012;76(1):70-81.
87. Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology*. 2014;29:1-8.
88. Navarrete M, Díez A, Araque A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2014;369(1654):20130599.
89. Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN neuro*. 2012;4(2).
90. Gadzicki D, Müller-Vahl K, Stuhmann M. A frequent polymorphism in the coding exon of the human cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Molecular and cellular probes*. 1999;13(4):321-3.
91. Gray JM, Vecchiarelli HA, Morena M, Lee TT, Hermanson DJ, Kim AB, et al. Corticotropin-releasing hormone drives anandamide hydrolysis in the amygdala to promote anxiety. *The Journal of neuroscience*. 2015;35(9):3879-92.
92. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature medicine*. 2003;9(1):76-81.
93. Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF. Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *The Journal of neuroscience*. 2003;23(9):3916-23.
94. Chiang KP, Gerber AL, Sipe JC, Cravatt BF. Reduced cellular expression and activity of the P129T mutant of human fatty acid amide hydrolase: evidence for a link between defects in the endocannabinoid system and problem drug use. *Human molecular genetics*. 2004;13(18):2113-9.

95. Hariri AR, Gorka A, Hyde LW, Kimak M, Halder I, Ducci F, et al. Divergent effects of genetic variation in endocannabinoid signaling on human threat- and reward-related brain function. *Biological psychiatry*. 2009;66(1):9-16.
96. Spagnolo PA, Ramchandani VA, Schwandt ML, Kwako LE, George DT, Mayo LM, et al. FAAH Gene Variation Moderates Stress Response and Symptom Severity in Patients with Posttraumatic Stress Disorder and Comorbid Alcohol Dependence. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2016;40(11):2426-34.
97. Zhang PW, Ishiguro H, Ohtsuki T, Hess J, Carillo F, Walther D, et al. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Molecular psychiatry*. 2004;9(10):916-31.
98. Ewald A, Becker S, Heinrich A, Banaschewski T, Poustka L, Bokde A, et al. The role of the cannabinoid receptor in adolescents' processing of facial expressions. *The European journal of neuroscience*. 2016;43(1):98-105.
99. Gosso MF, de Geus EJ, Polderman TJ, Boomsma DI, Heutink P, Posthuma D. Catechol O-methyl transferase and dopamine D2 receptor gene polymorphisms: evidence of positive heterosis and gene-gene interaction on working memory functioning. *European journal of human genetics*. 2008;16(9):1075-82.
100. De Jesús ML, Sallés J, Meana JJ, Callado LF. Characterization of CB1 cannabinoid receptor immunoreactivity in postmortem human brain homogenates. *Neuroscience*. 2006;140(2):635-43.
101. Weissman MM, Klerman GL. Sex differences and the epidemiology of depression. *Archives of general psychiatry*. 1977;34(1):98-111.
102. Andrade TG, Nakamuta JS, Avanzi V, Graeff FG. Anxiolytic effect of estradiol in the median raphe nucleus mediated by 5-HT1A receptors. *Behavioural brain research*. 2005;163(1):18-25.
103. Picazo O, Estrada-Camarena E, Hernandez-Aragon A. Influence of the post-ovariectomy time frame on the experimental anxiety and the behavioural actions of some anxiolytic agents. *European journal of pharmacology*. 2006;530(1-2):88-94.
104. Walf AA, Frye CA. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(7):1288-301.
105. Walf AA, Rhodes ME, Frye CA. Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2004;78(3):523-9.

106. Hill MN, Karacabeyli ES, Gorzalka BB. Estrogen recruits the endocannabinoid system to modulate emotionality. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(4):350-7.
107. Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ 1 opioid receptor mechanism. *Science*. 1997;276(5321):2048-50.
108. Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *The British journal of psychiatry*. 2001;178(2):101-6.
109. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 1996;91(11):1585-614.